

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

В. Скулачев

В. Скулачев
Рассказы о биоэнергетике



В. СКУЛАЧЕВ

Рассказы о биоэнергетике



МОСКВА
«МОЛОДАЯ ГВАРДИЯ»
1985

28.071
С46

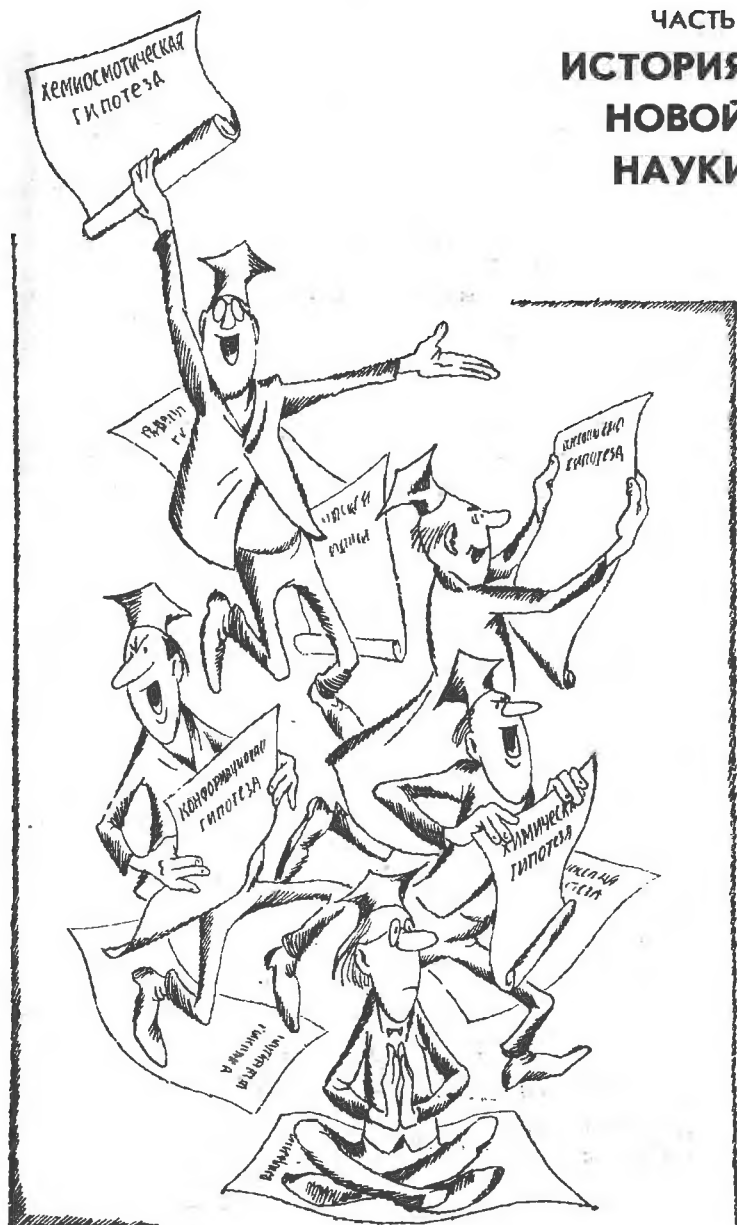
ИЗДАНИЕ ВТОРОЕ

С $\frac{2001040000-292}{078(02)-85}$ 286-85

© Издательство «Молодая гвардия», 1982 г.

ЧАСТЬ I

ИСТОРИЯ НОВОЙ НАУКИ



ЧЕМ ЗАНИМАЮТСЯ БИОЭНЕРГЕТИКИ?

РОЖДЕНИЕ БИОЭНЕРГЕТИКИ

...1968 год. Маленький, ослепительно белый итальянский городок Полиньяно на берегу Адриатического моря изнывает от майского зноя. А во дворце графа Мьяни полумрак и прохлада. За овальным столом, покрытым толстым зеленым сукном, течет неспешная беседа. Здесь симпозиум, но не в древнем смысле, который, вероятно, был бы уместнее в этом старинном доме («симпозиум» — «собрание с вином и женщинами»). На столе нет вина, а немногие женщины в зале — сплошь ученые дамы.

Один из научных симпозиумов, которым сегодня нет числа, в общем-то закончен. Полсотни биохимиков собрались с разных концов света на несколько дней, чтобы оценить глубину своего неведения о сущности одного из обычных для биологии чудес. Завтра они разъедутся по домам, так и не узнав, каким именно образом живое существо использует окружающий мир для получения необходимой ему энергии. Позади доклады о маленьком фактах и больших идеях, споры здесь, во дворце, и на морском берегу, размышления в тиши нашего временного, но комфортабельного пристанища — отеля, вырубленного прямо в нависающей над морем скале.

Да, ясности еще нет. Нет точного знания, которое позволяет, например, собрать автомобиль по изготовленному конструктором чертежу. Надо еще работать и работать. Это понимают все: и скептики, и оптимисты, сидящие за зеленым столом, — скромнейший старец сэр Г. Кребс, первооткрыватель самого знаменитого, названного в его честь биохимического цикла, нобелевский лауреат, чье имя еще при жизни было выбито на медали, вручаемой за особые заслуги перед наукой Федерацией европейских биохимиков; Л. Эрнстер из Швеции, поптичь склоняющий голову набок и посверкивающий из-под седых бровей острым взглядом голубых глаз; грузный, флегматичный американец Б. Прессман; отчаянные спорщики — итальянцы Э. Квальярелло, Дж. Акцоне, С. Папа...

Вдруг австралиец Э. Слейтер, похожий с виду на пастора, поднимает два пальца и говорит:

— Нам нужно выбрать имя. Давайте, наконец, как-нибудь назовем то, чем мы с вами занимаемся.

Будь Слейтер красноречивей, он сказал бы, наверно, что настал час поднять свой собственный флаг, что в нашем деле забрезжила надежда на успех, что уже виден путь к нему, долгий и трудный путь, в конце которого нам, может быть, откроется чертеж механизма, изобретенного природой, чтобы обеспечить энергией все проявления жизни.

Сначала разъять живую клетку на молекулы, отобрать среди них только те, что отвечают за энергообеспечение клетки, пока она жива, и затем воссоздать из этих молекул трансформирующий энергию механизм — вот путь познания, если мы хотим уяснить, как клетка обеспечивает себя энергией.

Похожий путь однажды уже одолели биологи, исследовавшие другое свойство живого существа, столь же универсальное, как функция энергообеспечения, а именно способность производить себе подобных. Оказалось, что среди великого множества веществ, составляющих клетку, есть только одно, наделенное возможностью создавать свою копию, — это особый биополимер — дезоксирибонуклеиновая кислота, ДНК. Из клетки удалось выделить ДНК и белок — фермент, помогающий этой молекуле при ее воспроизводстве (репликации). Затем были найдены условия для того, чтобы два партнера — ДНК и фермент — вели синтез новых молекул ДНК из соответствующего строительного материала — нуклеотидов.

На взгляд химика, ДНК и белок — весьма сложные молекулы. Для биолога это предельно простая система, поскольку дальнейшее ее упрощение с неизбежностью ведет к потере биологического свойства. Расщепив полимерные молекулы ДНК и белка на мономеры (нуклеотиды и аминокислоты), мы получаем смесь низкомолекулярных соединений, лишенную всякой способности к самовоспроизведению. Вот почему молекулярная генетика имеет дело с макромолекулами. Это справедливо и для других разделов молекулярной биологии — науки, изучающей ту или иную биологическую функцию на уровне макромолекул или их комплексов.

Молекулярная биология — есть биология высокомолекулярных соединений. Не может быть биологии низкомолекулярных веществ. Тем более нельзя говорить о субмолекулярной биологии, квантовой биологии и т. п. Фактически эти термины лишены смысла и лишь вводят в заблуждение.

Но хоть молекулы биополимеров и сложны, они все же индивидуальные химические соединения. Поэтому уровень точности знаний, достигнутый химией, в принципе достижим и в молекулярной биологии. Здесь биология впервые становится действительно точной наукой в самом своем существе.

Нет сомнений, что прорыв биологии на точный молекулярный уровень должен иметь самые важные последствия как для науки, так и для практической деятельности человека. И в общем-то можно понять амбиции молекулярных биологов, рассматривающих изучение каждой из фундаментальных функций живой клетки как самостоятельную научную отрасль, которая имеет право на свое собственное имя.

Любое проявление жизни связано с затратами энергии. Живое существо, пусть даже такое мелкое, как бактерия, — это чрезвычайно сложная и совершенная система, создание которой потребовало миллионы веков эволюционного развития. Чтобы поддерживать существование такой системы, стремящейся перейти в более устойчивое с точки зрения термодинамики неживое состояние, необходим постоянный приток свободной энергии.

Мозг, лишенный доступа кислорода, погибает через несколько минут. В других органах также происходят необратимые изменения при нарушении доставки энергетических ресурсов, хотя этот трагический момент наступает чуть позже, чем в мозге.

Правда, описаны бактерии, все еще сохраняющие нормальную жизнедеятельность в течение нескольких часов после истощения внешних источников энергии. Но это уже один из тех рекордов, которые преподносит нам время от времени мир микробов с их поразительной способностью приспосабливаться к неблагоприятным условиям.

Итак, одна из функций, присущих всему живому, — способность к энергообеспечению за счет тех или иных внешних энергетических ресурсов. Как же назвать на-

уку, изучающую энергообеспечение живых существ? Тогда, в Полиньяно, после недолгого спора остановились на *биоэнергетике*.

(Слово «биоэнергетика» вошло в обиход с легкой руки А. Сцент-Дьердьи, прославившегося в свое время выделением первого витамина — аскорбиновой кислоты. Так называлась небольшая книжка, опубликованная Сцент-Дьердьи в 1956 году. В этом труде можно было, как всегда, найти множество увлекательных мыслей и гипотез, но случилось так, что испытание временем выдержало лишь слово, вынесенное автором на обложку.)

Сначала в некоторых биологических центрах появились группы, лаборатории, отделы биоэнергетики (одним из первых был отдел биоэнергетики в МГУ, созданный в 1965 году). Затем с конца 60-х годов стали издаваться журналы и сборники по биоэнергетике, пошли симпозиумы, конференции, курсы под этим названием. И вот сегодня биоэнергетика — одно из популярных научных направлений со своим кругом идей, объектов и методов, своими лидерами и соперничающими школами, словом, интернациональный организм, живущий и развивающийся по собственным законам.

Вслед за известными успехами этой ветви биологии пришла мода и появилась тенденция писать слово «биоэнергетика» во всех случаях, где речь идет об энергетическом аспекте живых систем, невзирая на степень их сложности. В этом смысле первым биоэнергетиком нужно признать Платона, размышлявшего о судьбе пищи в организме. Что же до современных исследователей, пытающихся добыть точные сведения о биологических преобразователях энергии, то их придется величать «молекулярными биоэнергетиками».

В этих очерках я буду держаться того определения биоэнергетики, о котором мы договорились семнадцать лет назад в Полиньяно, «в час жаркого весеннего заката». Не общие соображения и не внешнее, всегда приблизительное описание превращений энергии в клетке, а точный чертеж биологического трансформатора — вот цель, смысл, «сверхзадача» биоэнергетики. В этой книге я хочу рассказать о том, как биоэнергетики пытаются решить свою сверхзадачу. Речь пойдет об успехах и неудачах молодой науки, о людях, посвятивших себя биоэнергетике, и о путях, которые они выбирают.

Я не могу обещать вам легкого чтения. Если вы взялись за эту книгу, чтобы узнать кое-что о новой науке — биоэнергетике, вам придется иногда напрягать свой интеллект. Моя цель — ввести вас в круг основных идей и сведений о молекулярном механизме одной из важнейших функций живого организма — функции энергообеспечения.

В первой части книги речь пойдет об истории становления биоэнергетики и основных понятиях этой отрасли биологии. Более детальное рассмотрение устройства главных биологических преобразователей энергии — белков — генераторов тока, этих электростанций размером в молекулу, можно найти во второй части.

По ходу рассказа я попытаюсь показать, как делается современная наука. Излагая свои работы более подробно, чем некоторые результаты других ученых, я надеюсь на снисхождение читателей: рассказчик, говоря о событии, всегда стремится подробнее описать эпизод с его непосредственным участием.

Биоэнергетика — очень молодая наука. Еще нет учебника, к которому можно было бы отослать любознательного читателя. Есть лишь обзорные статьи, доступные только специалистам. И если мне удастся понизить барьер в восприятии новых представлений об энергообеспечении живых организмов, то я сочту, что эта книга выполнила свою основную задачу.

ЧТО ТАКОЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН?

КАК КЛЕТКА ПОЛУЧАЕТ И ИСПОЛЬЗУЕТ ЭНЕРГИЮ

Чтобы жить, надо работать. Эта житейская истина вполне

не приложима к любым живым существам. Все организмы: от одноклеточных микробов до высших животных и человека — непрерывно совершают различные типы работы. Таковы движение, то есть *механическая* работа при сокращении мышц животного или вращении жгутика бактерии; синтезы сложных химических соединений в клетках, то есть *химическая* работа; создание разности потенциалов между протоплазмой и внешней средой, то есть *электрическая* работа; перенос веществ из внешней среды, где их мало, внутрь клетки, где их больше, то есть *осмотическая* работа. Помимо перечисленных четырех *основных* типов работы, можно упомянуть *образование тепла* теплокровными животными в ответ на понижение температуры окружающей среды, а также *образование света* светящимися организмами.

Все это требует затрат энергии, которая черпается из тех или иных внешних энергетических ресурсов. Первичным источником энергии для биосферы служит солнечный свет, усваиваемый фотосинтезирующими живыми существами: зелеными растениями и некоторыми бактериями. Создаваемые этими организмами биополимеры (углеводы, жиры и белки) могут затем использоваться в качестве «топлива» всеми остальными — гетеротрофными — формами жизни, к которым относятся животные, грибы и большинство видов бактерий.

Биополимеры пищи могут быть весьма разнообразны: это сотни различных белков, жиров и полисахаридов. В организме происходит распад этого «топлива». Прежде всего полимерные молекулы распадаются на составляющие их мономеры: белки расщепляются на аминокислоты, жиры — на жирные кислоты и глицерин, полисахариды — на моносахариды. Общее количество различных типов мономеров измеряется уже не сотнями, а десятками.

В дальнейшем мономеры превращаются в небольшие



по величине моно-, ди- и трикарбоновые кислоты с числом углеродных атомов от 2 до 6. Этих кислот всего десять. Их превращение замкнуто в цикл, названный циклом Кребса в честь его первооткрывателя.

В цикле Кребса происходит окисление карбоновых кислот кислородом до углекислого газа и воды. Именно образование воды в результате реакции молекулярного кислорода с водородом, отщепленным от карбоновых кислот, сопровождается наибольшим выделением энергии, в то время как предшествующие процессы служат главным образом лишь подготовкой «топлива». Окисление водорода кислородом, то есть реакция гремучего газа ($O_2 + 2H_2 = 2H_2O$), в клетке разбито на несколько стадий, так что освобождающаяся при этом энергия выделяется не сразу, а порциями.

Так же порциями происходит освобождение энергии, поступающей в виде кванта света, в клетках организмов-фотосинтетиков.

Итак, в одной и той же клетке существует, во-первых, несколько реакций освобождения энергии и, во-вторых, множество процессов, идущих с поглощением энергии. Посредником этих двух систем, совокупность которых называется энергетическим обменом, служит особое вещество — аденозинтрифосфорная кислота (АТФ).

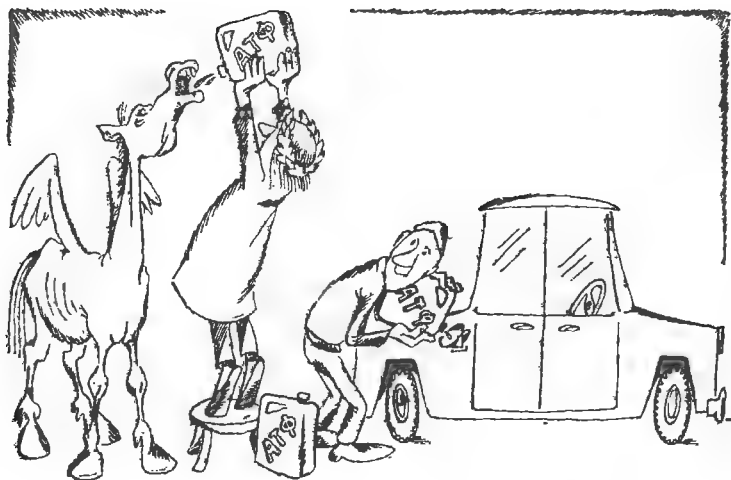
Для энергетического обмена клетки очень важны так называемые сопряженные химические реакции. В каждой такой реакции связываются воедино два различных процесса: один, сопровождающийся выделением энергии, и другой, требующий ее затрат. В результате оказывается, что первый (энергодаяющий) процесс становится движущей силой для второго процесса, потребляющего энергию.

В начале 40-х годов известный биохимик Ф. Липман высказал гипотезу, что различные реакции освобождения энергии в клетке всегда сопряжены с одной и той же реакцией, а именно синтезом АТФ из ее предшественников — аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) и неорганической ортофосфорной кислоты (H_3PO_4). С другой стороны, реакции расщепления (гидролиза) АТФ до АДФ и H_3PO_4 сопряжены, по Липману, с совершением различных типов полезной работы. Другими словами, образование АТФ служит универсальным накопителем энергии, а расщепление АТФ — универсальным поставщиком энергии.

Еще до публикации гипотезы Липмана советские ученые, В. Энгельгардт и В. Белицер, установили, что внутриклеточное дыхание, то есть окисление водорода карбоновых кислот кислородом, сопряжено с синтезом АТФ. Образование АТФ было показано также при гликолизе (расщепление углеводов до молочной кислоты в отсутствие кислорода). В 50-е годы американский биохимик Д. Арнон продемонстрировал синтез АТФ у растений за счет энергии света.

В то же время были описаны многочисленные случаи энергообеспечения работы клетки за счет гидролиза АТФ. Выяснилось, что синтез белков, жиров, углеводов, нуклеиновых кислот из соответствующих мономеров «оплачивается» энергией АТФ. В. Энгельгардт и М. Любимова обнаружили расщепление АТФ сократительным мышечным белком. Это открытие позволило понять, каким образом обеспечивается энергией работа мышцы. К настоящему времени несомненна причастность АТФ также и ко многим другим процессам, потребляющим энергию.

Итак, клетка использует энергетические ресурсы, чтобы получить АТФ, а затем тратит этот АТФ, чтобы оплатить различные виды работы.



ГДЕ И КАК ОБРАЗУЕТСЯ АТФ?

Первой системой, для которой выяснили механизм образования АТФ, оказался гликолиз — вспомогательный тип энергообеспечения, включающийся в условиях нехватки кислорода. При гликолизе молекула глюкозы расщепляется пополам и полученные обломки окисляются до молочной кислоты.

Такое окисление сопряжено с присоединением фосфорной кислоты к каждому из фрагментов молекулы глюкозы, то есть с их фосфорилированием. Последующий перенос фосфатных остатков с фрагментов глюкозы на АДФ дает АТФ.

Механизм образования АТФ при внутриклеточном дыхании и фотосинтезе долгое время оставался совершенно неясным. Было известно только, что ферменты, катализирующие эти процессы, встроены в биологические мембраны — тончайшие пленки (толщиной около одной миллионной доли сантиметра), состоящие из белков и фосфорилированных жироподобных веществ — фосфолипидов.

Мембраны — важнейший структурный компонент любой живой клетки. Внешняя мембрана клетки отделяет протоплазму от окружающей клетку среды. Кле-

точное ядро окружено двумя мембранами, которые образуют ядерную оболочку — преграду между внутренним содержимым ядра (нуклеоплазмой) и остальной частью клетки (цитоплазмой). Кроме ядра, в клетках животных и растений находят еще несколько структур, окруженных мембранами. Это эндоплазматическая сеть — система мельчайших трубочек и плоских цистерн, стенки которых образованы мембранами. Это, наконец, митохондрии — шарообразные или вытянутые пузырьки размером мельче ядра, но крупнее компонентов эндоплазматической сети. Диаметр митохондрии обычно около микрона, хотя иногда митохондрии образуют ветвящиеся и сетчатые структуры протяженностью в десятки микрон.

В клетках зеленых растений, помимо ядра, эндоплазматической сети и митохондрий, находят еще и хлоропласты — мембранные пузырьки более крупные, чем митохондрии.

Каждая из этих структур выполняет свою, специфическую биологическую функцию. Так, ядро — вместилище ДНК. Здесь происходят процессы, лежащие в основе генетической функции клетки, и начинается сложная цепь процессов, приводящая в конечном итоге к синтезу белка. Этот синтез завершается в мельчайших гранулах — рибосомах, большая часть которых связана с эндоплазматической сетью. В митохондриях происходят окислительные реакции, совокупность которых называется внутриклеточным дыханием. Хлоропласты отвечают за фотосинтез.

Клетки бактерий устроены проще. Обычно они имеют только две мембраны — внешнюю и внутреннюю. Бактерия — это как бы мешок в мешке, а точнее, очень мелкий пузырек с двойной стенкой. Здесь нет ни ядра, ни митохондрий, ни хлоропластов.

Существует гипотеза, что митохондрии и хлоропласты произошли из бактерий, захваченных клеткой более крупного и высокоорганизованного существа. Действительно, биохимия митохондрий и хлоропластов во многом напоминает бактериальную. Морфологически митохондрии и хлоропласты тоже в известном смысле подобны бактериям: они окружены двумя мембранами. Во всех трех случаях: в бактериях, митохондриях и хлоропластах — синтез АТФ происходит во внутренней мембране.

Долгое время считалось, что образование АТФ при дыхании и фотосинтезе протекает аналогично уже известному превращению энергии при гликолизе (фосфорилирование расщепляемого вещества, его окисление и перенос остатка фосфорной кислоты на АДФ). Однако все попытки экспериментально доказать эту схему оканчивались неудачей.

ОТ МИРМИКОЛОГИИ К БИОЭНЕРГЕТИКЕ

МУРАВЬИНЫЙ ЯЗЫК

Для меня эта история началась четверть века назад, когда на третьем курсе биофака МГУ я решил заняться тем, что сейчас мы называем биоэнергетикой, рискованной в общем-то областью биологии. Как правило, здесь ничего не увидишь, не уловишь на слух и не пощупаешь руками. Приходится доверять приборам, способным улавливать слабые отклики событий, сопутствующих превращениям энергии в мельчайших крупинках живой материи.

Здесь нет ничего сложнее, чем угадать единственно правильный путь среди тысячи, казалось бы, равных возможностей. И нет ничего проще, чем придумать новую гипотезу: достаточно располагать неким минимумом сведений и способностью логически мыслить.

В детстве я увлекался муравьями: в лесу искал их «столицы», следил за дорожками, расчищенными и утоптанными маленькими тружениками. Показывал приятелям разные виды муравьев, давая им собственные названия, а однажды под большим секретом сообщил своим друзьям, что узнал «муравьиный язык», и потом все лето сочинял истории, которые будто бы рассказывали мне мои шестиногие собеседники. Мальчишки верили или просто делали вид, что верят, приняв тем самым правила игры.

Но вот в конце лета в компании появилась девочка постарше. Мое общение с муравьями ей показалось сомнительным, и она решила вывести фантазера на чистую воду. Неподалеку от нашей дачи был муравейник моих любимцев — крупных неторопливых черно-красных муравьев, которых я окрестил «красношейками». Втайне от нас девочка выкопала около муравейника небольшую ямку.

— Узнай у своих муравьев, откуда взялась эта ямка? — попросила она.

Что делать? Я выбрал «красношейку» поголовастей, посадил его в ямку и через минуту-другую водворил его на свою ладонь. Я внимательно наблюдал за беспоряд-

дочными движениями его усиков, мучительно соображая, кто бы мог вырыть злосчастную ямку! Я сразу понял, что это проверка. Но кто же мог меня проверять, кроме самой девочки, ведь ребятам очень нравились и рассказы о муравьиных войнах, и изготовление кораблей для муравьев, и поиски исторических мест муравьиных баталлий. Не могли же они сами разрушить весь этот замечательный мир! Значит, моей обличительнице никто не помогал!

— Муравей говорит, что эту ямку вырыла ты! Носком туфли!

Этот свой детский триумф я вспомнил на первой студенческой практике в Чашникове, когда среди предложенных нам самостоятельных работ по зоологии беспозвоночных обнаружил одну «муравьиную» тему. Сильно волнуясь, я спросил у преподавателя, можно ли заявиться муравьями именно мне. Согласие было получено, и, взяв с собой определитель насекомых, я немедленно отправился в ближайший лес на поиски местных муравьев.

Вскоре выяснилось, что здесь тоже водится мой любимый «красношейка», который в действительности называется «красногрудый древоточец». По-латыни его имя звучало для меня как гимн: *Camponotus herculeanus*. Это торжественное сочетание звуков говорило само за себя, особенно рядом с названием суматошного рыжего «лесняка», который оказался всего лишь муравьем лесным, *Formica rufa rufa*.

Целыми днями я пропадал в лесу, испытывая чувство, которое можно сравнить с утолением жажды или радостью встречи после долгой разлуки с любимой женщиной, потерянной, казалось, навсегда.

Когда я рассказал о своей работе «Муравьи и защита растениями нектара от муравьев» на кафедре зоологии беспозвоночных, мне предложили специализироваться по этой кафедре. Соблазн был велик. Поступая в МГУ, я собирался стать биохимиком, но эту сложную науку изучают на старших курсах. А сейчас на столе лежит мой первый научный опус, уже получивший одобрение такого признанного мирмиколога (специалиста по муравьям), как профессор Арнольди, а доцент Абрикосов, высокий старик с пристальным взглядом голубых глаз и тонкими длинными пальцами собирателя коллекций, рассказывает мне о дальних экспедициях и повед-



ках полюбившихся с детства беззащитных трудолюбивых созданий.

Но я решил все же пойти в биохимики.

Мне не довелось больше заниматься муравьями, однако я никогда не жалел о днях, потраченных на мирмикологию. Эта скромная наука позволила почувствовать гармонию бесконечно сложного мира, каким оказывается любой живой организм под внимательным взглядом биолога. Я убежден, что такого рода занятия дают хороший иммунитет против поспешных упрощенных решений, которые часто предлагают нам химики и физики, пришедшие в биологию, так сказать, со стороны.

Что же до языка муравьев, то он был недавно открыт, и не без помощи биохимиков. Оказалось, что муравьи располагают, если угодно, «химическим» способом передачи информации. Они выделяют пахучие вещества разных типов, каждое из которых — сигнал к тому или иному коллективному действию.

Если, например, муравей находит добычу, неподъемную для одного, он возвращается к муравейнику, непрерывно орошая свой путь летучим эфиром определенного состава. Второй муравей, случайно наткнувшись на этот след, воспринимает запах эфира как сигнал, что надо бежать в сторону ослабления запаха, то есть в направлении, противоположном тому, куда отправился первый

муравей, а стало быть, к неподъемной добыче. Так же поступают и другие муравьи, напавшие на след первого, и вскоре у добычи оказывается достаточное количество «носильщиков».

Обладая набором эфиров, выделяемых муравьями, можно управлять полчищами насекомых, заставляя, например, бесчисленную муравьиную семью в какой-то момент сняться с обжитого места, покинуть муравейник и отправиться по прочерченному вами на земле маршруту.

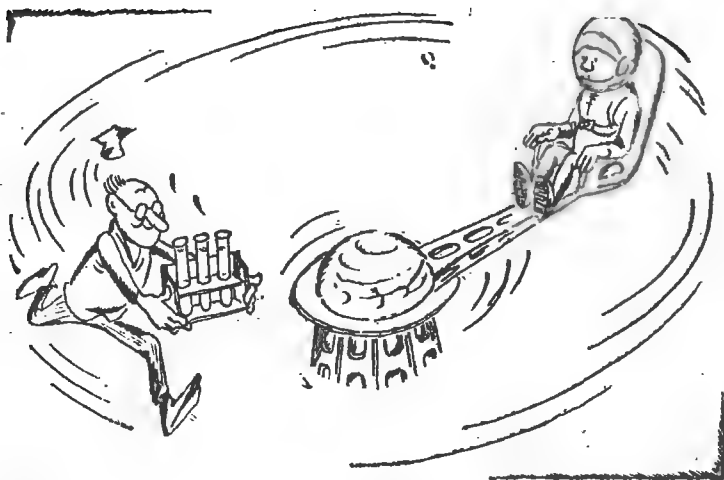
МИТОХОНДРИИ ПРОИЗВОДЯТ АТФ В ПРОБИРКЕ

На кафедре биохимии животных, куда я попал после экскурсии в мирмикологию, опыт обычно начинали с того, что животному отрезали голову. Уже сам по себе этот акт, в научных протоколах обозначавшийся как «декапитация», символизировал биохимический подход к изучению жизненных явлений. Биохимик стремится анализировать их на более простых, чем организм, системах, таких, как органы, ткани, тканевые срезы, клетки, внутриклеточные частицы и, наконец, индивидуальные вещества биологического происхождения. Чем проще объект, тем вернее успех, и так вплоть до предела, за которым исчезает интересующее нас биологическое свойство.

В биоэнергетике середины 50-х годов «точка исчезновения интереса» лежала на уровне митохондрий. Опыт ставили следующим образом. У обезглавленной только что крысы (кролика, голубя и т. п.) извлекали печень, разрезали ножницами на кусочки размером 1—3 кубических миллиметра и смешивали с раствором специально подобранного состава, предотвращающим немедленное разрушение митохондрий и порчу их ферментов.

Затем смесь гомогенизировали; то есть измельчали до такого состояния, чтобы разрушить оболочки клеток. Для этой цели применяли несложный прибор, состоящий из мотора, тефлонового пестика и широкой стеклянной пробирки, диаметр которой чуть больше толщины пестика. Вращение пестика приводило к разрыву клеток, попавших в зазор между внутренней стенкой пробирки и пестиком. В результате клеточное содержимое смешивалось с добавленным раньше раствором, и получался так называемый гомогенат.

Следующая стадия — выделение митохондрий из го-



могената, в котором содержатся и другие компоненты — клеточные ядра, обломки оболочки и различных внутриклеточных мембран и, наконец, клеточный сок — жидкая часть протоплазмы.

Каждый из этих компонентов имеет свой характерный удельный вес, что и используется для их разделения. В принципе разделение должно произойти само по себе, если просто оставить пробирку с гомогенатом стоять достаточно долгое время. Сначала на дно оседут самые тяжелые частицы — неразрушенные клетки и кусочки ткани, затем появится слой ядер и обломков клеточной оболочки. Потом настанет черед митохондрий и т. д. Кстати, именно так выделяют эритроциты из крови, оставляя кровь постоять в пробирке или капиллярной трубке. В этом суть РОЭ — реакции оседания эритроцитов — известного всем медицинского анализа крови.

Но эритроциты — это клетки, а интересующие нас митохондрии — внутриклеточные частицы и, стало быть, нечто более мелкое, чем клетки. Их диаметр всего несколько микрон; состоят митохондрии из белков и легких жироподобных веществ — фосфолипидов и поэтому оседают очень медленно. Чтобы ускорить этот процесс, применяют центрифугирование. Вращение пробирки, помещенной в центрифужный ротор, многократно увеличивает силу тяжести. Если задать такую скорость вращения, чтобы сила тяжести возросла в 10 тысяч раз, то

нескольких минут оказывается достаточно, чтобы отбросить митохондрии на дно пробирки.

...Передо мной центрифужная пробирка, а в ней коричневатый осадок, похожий на печеночный паштет. Здесь должны быть миллиарды отдельных митохондрий. Так ли это? Посмотрим в микроскоп. На пределе увеличения видны чуть вытянутые частицы. Они находятся в беспорядочном движении — броунируют. Добавляю каплю красителя «янус зеленый». Если частицы окрасятся в зеленый цвет, значит, это митохондрии. Частицы зеленеют. Пока все идет нормально. Но к чему еще способны эти митохондрии, безжалостно вырванные из привычной среды и лишенные своих партнеров по протоплазме?

В 1949 году американцы Э. Кеннеди и А. Ленинджер доказали, что изолированные митохондрии печени способны на главное — они окисляют вещества кислородом и за счет получаемой таким образом энергии синтезируют АТФ. Спустя шесть лет тот же опыт повторил на кафедре биохимии животных МГУ дипломник из ГДР Г. Шарфшверт. Мне, студенту-третьекурснику, надо овладеть его ремеслом, ведь через год он уедет в Берлин вместе со всеми секретами этого тонкого опыта.

Я взбалтываю осадок митохондрий, прилив к нему все тот же «щадящий» раствор, дополненный окисляемыми веществами и фосфатом, и помещаю суспензию в сосудик Варбурга — смешное создание фантазии стеклодувов, похожее на толстую бабу с ведрами на коромысле. Сосудик прикрепляется к манометру и помещается в водяную баню с температурой 37 градусов (пусть хотя температура будет как в организме!).

Теперь все внимание на уровень жидкости в манометре. Если в митохондриях протекают окислительные реакции, должен потребляться кислород и давление в сосудице будет падать. И действительно, манометр регистрирует падение давления. Митохондрии «дышат»!

Что же, полдела сделано. Остается посмотреть, не уменьшилось ли количество фосфата; ведь он один из субстратов реакции фосфорилирования, и его количество должно убывать, если дыхание сопряжено с синтезом АТФ. Вынимаю сосудик из бани, набираю в пипетку трихлоруксусную кислоту...

Вдруг вспоминаются лето, школьные каникулы. Я ловлю прыткого черного жука, перебегающего прогретую солнцем утопанную дорожку. Опять жужелка — ничего интересного, только на руках остается резкий, необычный запах... Теперь я уже знаю, что это запах трихлоруксусной кислоты. Она денатурирует белки-ферменты, и жужелица использует ее как «химическое оружие» против своих врагов. А я сейчас убью этим оружием митохондрии, чтобы мгновению остановить все протекающие в них ферментативные процессы.

Еще час работы, и проведена цветная реакция на неорганический фосфат. Он действительно убывал в сосудике с митохондриями. Биологические трансформаторы энергии действовали!

ДВА ПУТИ

ФАКТ ИЛИ АРТЕФАКТ?

Профессор С. Северин, узнав, что вслед за Шарфшвертом я освоил заокеанскую методику, попросил применить ее к другому объекту: вместо печени крысы надо было взять грудную мышцу голубя. План моего руководителя состоял в том, чтобы воспроизвести на мышечных митохондриях окислительный синтез АТФ, уже описанный для печени, и посмотреть, не будет ли регулироваться этот процесс карнозином и ансерином — двумя специфичными для мышц веществами с неясной биологической функцией, открытыми его учителем В. Гулеви-чем в начале века.

Я выделил митохондрии из голубиных мышц и, по-колдовав с растворами для сосудов Варбурга, вскоре получил синтез АТФ, сопряженный с окислением одной из карбоновых кислот — пировиноградной. Тогда я взял аскорбиновую кислоту, которая в опытах на печеночных митохондриях тоже окислялась сопряженно с образованием АТФ. К моему удивлению, окисление этого второго вещества протекало без синтеза АТФ.

Я повторил опыт с митохондриями печени в условиях, идентичных тем, что были подобраны для мышц, и вновь получил убыль фосфата как с пировиноградной, так и с аскорбиновой кислотами. Новый опыт с мышцей, и опять тот же странный результат: с одной кислотой дыхание и фосфорилирование, а с другой — такое же (по скорости) дыхание, но никакой убыли фосфата.

Проще всего мое наблюдение было бы отнести в разряд артефактов, то есть всех тех многочисленных явлений, которые отсутствуют в живой природе и создаются искусственно в условиях биологического эксперимента. Как говорится, снявши голову, по волосам не плачут. Убили животное, искромсали, размозжили его ткани, так стоит ли удивляться, что один из механизмов жизнедеятельности работает теперь в каком-то неполноценном режиме, когда при сжигании пищи в митохондриях энергия еще освобождается, но уже не используется для производства АТФ.



Мне шел тогда двадцать второй год. Опыт с двумя кислотами, по-разному окислявшимися в митохондриях голубиных мышц, был первым моим новым наблюдением: ведь раньше таких экспериментов никто не ставил. В этом нетрудно было убедиться, так как работы по энергетике митохондрий в то время проводились всего в нескольких лабораториях и собрать литературу по исследуемому вопросу не составляло большого труда. И что же, мое первое наблюдение — артефакт?

С этим унижительным, как мне казалось, выводом я никак не мог примириться. Не торопил меня подписаться под таким заключением и профессор Северин. Он снисходительно наблюдал мой энтузиазм, сопутствовавший началу работы, а потом разочарование нелепым результатом.

— Корень ученья горек, а плод, Володя, поверьте мне, кислый! — сказал руководитель однажды, когда я вновь пришел к нему с очередным вариантом опыта, принесшим все тот же неутешительный итог.

Вскоре я прекратил опыты и засел за литературу, чтобы посмотреть, не видел ли кто-нибудь нечто столь же странное пусть не в моей системе, а в аналогичной. Ведь если даже мой результат и смахивал на артефакт,

то артефакт этот был какой-то необычный, не поддающийся простому объяснению.

Допустим, что митохондрии как-то «сломались» при их выделении из мышц, но почему эта поломка оказалась только на судьбе одного из двух окисляемых веществ? Ведь окисляются они через общий путь, так называемую дыхательную цепь ферментов, и именно в дыхательной цепи происходит таинство превращения энергии дыхания в энергию АТФ.

Я допоздна засиживался в библиотеке, конспектируя статьи по митохондриям, и в конце концов обнаружил одно наблюдение, сделанное А. Ленинджером в опыте с митохондриями печени, когда два вещества, причем вовсе не те, что выбрал я, тоже окислялись в двух различных режимах: одно с фосфорилированием, а другое без.

Ну что же, теперь я не одинок! Пусть знаменитый Ленинджер оставил без внимания обнаруженный им парадокс — для него ведь это далеко не первая тайна, которую посчастливилось подсмотреть у природы. А я еще подожду выбрасывать свое наблюдение в мусорную корзину для артефактов.

Итак, два вещества окисляются одним и тем же путем, но с разным результатом. Бред!

А что, если биохимики, изучая митохондрии, недосчитались еще одного окислительного пути? Если дыхательных цепей не одна, а две? Или цепь одна, но работать она может в двух режимах, из которых только один сопряжен с синтезом АТФ?

Так возникла мысль, которую я впоследствии назвал гипотезой о двух путях окисления.

Если бы в те дни мне сказали, что идея такого рода уже высказана год назад, и не кем-нибудь, а все тем же Ленинджером, я бы, конечно, очень огорчился. Но, к счастью, редкий источник — Гарвеевская лекция, где Ленинджер говорил о двух путях, дошел до Москвы с большим опозданием, когда работа по проверке гипотезы уже шла полным ходом. Я говорю «к счастью», потому что сознание первооткрывателя было движущей силой тогдашней моей работы. Лишь с годами возник бескорыстный интерес к тому, как же все-таки объясняются все эти чудеса, и пришло понимание того, что главное — быть на верной дороге, пусть даже указанной другими.

Будь я физиком или химиком, я заинтересовался бы прежде всего, как устроены два пути окисления. Но я биолог, и потому моей первой заботой было удостовериться, что два пути реально существуют и действуют в организме. Меня не отпускал прежний страх: а вдруг артефакт? Как же решить эту проблему?

Призовем на помощь логику. Два пути, два режима. Один дает накопление энергии (образуется АТФ), другой ведет к рассеянию энергии (образуется тепло). Простейшая мысль — первый путь полезен, второй бесполезен, если не вреден: ведь это растрата топлива.

Но не будем спешить с выводами, иначе мы рискуем попасть в положение профана, утверждающего, что автомобиль сломан, на том основании, что при отключенном сцеплении двигатель работает вхолостую.

Итак, один режим — выделение энергии и ее использование, другой — выделение без использования, то есть вся энергия идет в тепло. Но справедливо ли то, что полезность дыхания мы видим только в его способности поставлять АТФ? Ведь бывает же и противоположная ситуация, пусть необычная, но все же реальная, когда не АТФ, а тепло оказывается необходимым в первую очередь. Именно так обстоит дело с теплокровными животными при резком понижении температуры.

Давайте поставим животное на грань замерзания и посмотрим, не переключит ли оно свое дыхание на холостой ход? Если даже в таких крайних условиях ничего подобного не случится, то животное не умеет отключать дыхание от фосфорилирования, а два пути окисления — артефакт.

...Однажды к моему другу зоологу С. Маслову зашел Д. Афанасьев, аспирант кафедры высшей нервной деятельности. Он собирался заниматься гипотермией у птиц и искал подходящую модель.

— Чепуха, понимаешь ли, какая-то получается, — жаловался Дима. — Держу стриженного голубя в холодильнике при минус 20 градусах с вентилятором. Через 15 минут измеряю его температуру: на пять-шесть градусов снижена. Вот, думаю, и модель гипотермии! Так нет же, на другой день охлаждаю того же голубя еще раз, а он там битый час сидит — и хоть бы что, викакой гипотермии нет и в помине!



Чепуха. А может быть, это вовсе не Димина модель, а наша? Ведь если уж кому нужны кратчайшие пути теплопродукции, так это как раз такому животному, которое лишено систем так называемой физической терморегуляции (у птиц — оперения). Оно может поддерживать постоянство своей температуры при охлаждении исключительно за счет увеличения выработки тепла в тканях.

Мне не приходилось видеть ничего более жалкого, чем голубь без перьев. Дрожащий иссиня-красный комочек, стыдливо переминающийся с ноги на ногу и поглядывающий с укоризной на своих мучителей. Нет, такой не вынесет двадцатиградусного мороза с ветром!

Спустя полчаса после начала опыта мы вынули из холодильника полумертвую птицу с температурой тела около 30 градусов вместо нормальной для голубя 41,5. Измерили дыхание и синтез АТФ в мышечных митохондриях. Оба показателя были близки к норме. Дыхание по-прежнему сопровождалось синтезом АТФ. Да, видно, не умеет голубь разобщать дыхание и фосфорилирование...

А может быть, умеет, да не успевает за те полчаса, которые длится наш жестокий опыт? Продлить его невозможно, несчастное животное просто умрет. Единственный выход — повторить охлаждение, дав голубю какое-то время на передышку.

На следующий день поведение голубя разительно отличалось от той трагической картины, что мы видели накануне. Снизив температуру на два-три градуса, голубь умудрился каким-то образом остановить дальнейшее остывание тела. Через три часа после начала охлаждения, заглянув в очередной раз в холодильник, мы обнаружили, что голубь ведет себя вполне бодро и как-то даже агрессивно поглядывает на нас из своего ледяного плена. Ну а как там его митохондрии?

Есть разобщение! Дыхание отключилось от синтеза АТФ. Энергия больше не накапливалась, а тотчас превращалась в тепло.

Потом такой же опыт был проделан на мышах, и вновь при повторном охлаждении наблюдалось разобщение дыхания и фосфорилирования. Охлаждаясь впервые, мыши, как и голуби, не успевали (в наших суровых условиях опыта) отключить синтез АТФ и гибли, если охлаждение не прекращалось. С. Маслову удалось продлить им жизнь инъекцией искусственного разобщителя динитрофенола, вещества, о котором было известно, что оно нарушает сопряжение дыхания и фосфорилирования при добавлении к митохондриям.

Совсем недавно, спустя двадцать лет после этих опытов, нашу работу повторили молодые биоэнергетики, норвежец Г. Грав и американец с Аляски А. Бликс, используя мышечные митохондрии совсем другого животного — детенышей северных морских котиков. Оказалось, что в естественных условиях, плавая в холодных, около шести градусов, водах Берингова моря, котики имеют высокую скорость дыхания, которое не зависит от того, синтезируется АТФ или нет. Сопряжение дыхания с фосфорилированием можно было упрочить, выдерживая котиков на воздухе при плюс 20 градусах.

Любопытно, что Г. Грав и А. Бликс впали, по-видимому, в ту же ошибку, как когда-то и я с Гарвеевской лекцией А. Ленинджера. Они вели свою работу, не зная о наших опытах двадцатилетней давности, и свою публикацию в журнале «Сайенс» представили как открытие новой, термогенной функции нефосфорилирующего дыхания в мышцах. Что же, их заблуждение (если оно было невольным) наверняка помогло преодолеть необычайные трудности работы с митохондриями на острове Св. Павла, где им пришлось ставить эти опыты.

Опыты на котиках подтвердили, что в естественных условиях действует механизм, который был обнаружен нами в лабораторном эксперименте и назван терморегуляторным разобщением дыхания и фосфорилирования.

БУРЫЙ ЖИР

Теплопродукция — дополнительная функция мышечной ткани. Мышца выполняет роль грелки, так сказать, по совместительству с механической работой. Но есть ткань, которая, как оказалось, специализирована на образовании тепла. Это бурый жир.

В верхней части спины теплокровных зоологи давно уже обнаружили островки жировой ткани необычного для жира коричневого цвета. Они облегают крупные кровеносные сосуды, идущие к головному мозгу. Особенно много этой ткани у новорожденных. С возрастом ее количество уменьшается, и только у впадающих в зимнюю спячку животных бурый жир сохраняется в значительном количестве на протяжении всей жизни.

Так вот, выяснилось, что коричневый цвет необычной жировой ткани обусловлен митохондриями, которыми буквально забиты ее клетки. Физиологи давно уже подозревали участие бурого жира в терморегуляции. Когда же стало ясно, что он богат митохондриями, а митохондрии такой ткани, как мышца, способны при охлаждении переводить свое дыхание на холостой ход, возникла мысль посмотреть, как там у бурого жира с энергетикой. Работы велись в основном в трех лабораториях: Р. Смитом в США, О. Линдбергом в Швеции и З. Драхотой в Чехословакии. И вот что обнаружилось.

Митохондрии бурого жира содержат почти в 10 раз меньше синтезирующего АТФ фермента по сравнению с митохондриями других тканей. В то же время количество ферментов дыхания находится на обычном уровне. Тем самым система, ответственная за освобождение энергии, оказывается в огромном избытке по сравнению с системой запасаения энергии. Уже сам по себе этот факт свидетельствует, что не синтез АТФ, а образование тепла — главная функция митохондрий бурого жира. Такое предположение было подтверждено прямыми опытами, когда исследовали животных, подвергнутых охлаждению. В митохондриях бурого жира наблю-

далось сильное разобщение дыхания и фосфорилирования.

В этой связи стала понятной своеобразная локализация бурого жира в организме: он согревает кровь, протекающую к мозгу. Благодаря открытию эффекта разобщения в митохондриях бурого жира удалось заполнить недостающее звено в цепи событий, совершающихся при пробуждении животного от спячки.

...Задолго до холодов хомяк оборудует себе зимнюю квартиру. Это глубокая нора, в которую ведет узкий вход. С наступлением морозов хомяк заделывает вход соломой, чтобы нору не продувало студеными ветрами. Теперь можно и соснуть до весны. Хомяк уютно устраивается в гнезде из сена, что припасено в дальнем конце норы, и засыпает. Но сон этот необычный. Постепенно тело хомяка остывает, все жизненные процессы замирают, вернее, замедляются, и не как-нибудь, а в такой степени, чтобы поддерживать температуру на минимальном уровне, чуть-чуть выше нуля.

Давайте проведем теперь такой опыт. Разворошим соломенную заглушку у входа в нору. Если в степи мороз, то холод быстро проникнет внутрь норы. И что же хомяк? Замерзнет? Ведь просыпаться ему еще рано, до весны далеко!

Не беспокойтесь, ничего страшного не произойдет. Хомяк вскоре пробудится от холода, как просыпаемся и мы с вами, если мороз заползет в спальный мешок. Проснется, заделает как следует вход и ляжет снова досматривать многосерийный сон про жаркое лето...

— Все это, конечно, забавно, но при чем тут биоэнергетика? — спросите вы.

А дело было так.

Снижение температуры в норе немедленно зарегистрировали холодовые рецепторы кожи, которые бодрствуют даже при зимней спячке, когда все прочие органы чувств отключены. Нервы доставили сигнал бедствия по точному адресу — в мозг, в терморегуляторный центр гипоталамуса. Оттуда, из центра, понеслись ответные сигналы — приказы органам и тканям. Но как их выполнить, ведь температура органов слишком низка, чтобы ответить активными действиями на пришедший приказ?

Есть ткань, способная к самосогреванию, — это бурый жир. В ответ на сигнал из гипоталамуса нервные



окончания в буром жире начали выделять гормон норадреналин. Он был заготовлен впрок в специальных пузырьках, которыми нафаршированы нервные окончания. Вся нехитрая задача на этом этапе, чтобы пузырьки полопались. Ломать — не строить, и вот уже содержимое пузырьков выплеснулось в узкую щель между мембраной нервного окончания и клеткой бурого жира.

На поверхности клетки бурого жира особые белки (рецепторы) связали норадреналин. Белки эти, проникающие насквозь внешнюю мембрану клетки, активировали внутри клетки фермент адепилатциклазу, та сделала из АТФ циклический АМФ — особое вещество — регулятор ферментов, а этот последний присоединился к ферменту протеинкиназе. Протеинкиназа фосфорилировала следующий фермент — липазу. В результате липаза перешла в активное состояние и расщепила жир на глицерин и жирные кислоты.

Жирные кислоты — наиболее калорийное топливо для митохондрий и одновременно активатор для особого белка, переключающего дыхание на холостой ход. Активировалось холостое дыхание митохондрий, повысилась температура ткани.

С повышением температуры быстрее заработали дыхательные ферменты, значит, увеличилось образование тепла. Налицо автокатализ. За топливом (жирными

кислотами) дело не стало. Ведь в клетках бурого жира, кроме митохондрий, есть еще и жировые капли (на то он и жир!).

Разогрелся бурый жир, повысилась температура крови в сосудах, окруженных бурым жиром, теплая кровь поступила в мозг, а затем и в другие органы. Температура тела поднялась, зверек проснулся!

Вы спросите, зачем такая сложная, многоступенчатая система сигналов? Так ведь это же каскад усиления! Одна молекула гормона активирует одну молекулу аденилатциклазы, которая производит уже не одну, а множество молекул циклического АМФ. Каждая молекула циклического АМФ может активировать одну молекулу протеинкиназы, которая, в свою очередь, фосфорилирует множество липаз, и т. д. А на выходе повышение температуры, которое активирует *все без исключения* звенья каскада. Ответ такой системы на воздействие нарастает лавинообразно. Ну как тут хомяку не проснуться?

Образование тепла бурым жиром лишь частный случай из удивительной области регуляции биохимических процессов. О каждом из таких механизмов можно написать отдельную книгу. Однако наш главный интерес лежит сейчас в иной плоскости. Рассказ о хомяке и буром жире я здесь привел главным образом для того, чтобы показать существование специального биологического устройства, переводящего дыхание на холостой ход.

Итак, дыхание может быть отключено от фосфорилирования. Этого можно достичь искусственно, добавив динитрофенол или какое-либо другое вещество-разобщитель. Подобный эффект возникает и естественным путем в живом организме при воздействии холода. Таков феномен терморегуляторного разобщения окисления и фосфорилирования, открытый сначала в мышцах, а затем в ткани бурого жира.

Стало быть, окисление без фосфорилирования не артефакт, а реально существующий биохимический процесс. Именно этим свойством: способностью разобщать механизм освобождения энергии от механизма ее последующего накопления дыхание отличается от гликолиза — процесса, который наряду с дыханием призван обеспечивать клетку необходимой энергией.

В предыдущей главе мы уже говорили, что синтез

АТФ, сопряженный с дыханием, первоначально пытались уподобить описанной ранее реакции образования АТФ при гликолизе. Это был в общем-то естественный этап познания, когда неизвестное явление стремятся свести к комбинации уже известных фактов. Однако гликолиз — процесс, неразрывно связанный с фосфорилированием. Поэтому никакие аналогии с гликолизом не в состоянии помочь нам разобраться в механизме терморегуляторного разобщения дыхания и фосфорилирования.

Так как же должно быть устроено сопряжение двух процессов, чтобы была возможность их разобщения? Я вновь и вновь задавал себе этот вопрос и не находил разумного ответа.

КРЕПКИЙ ОРЕШЕК

**ЖЕРТВА
«ЗАКОНА ПАРКИНСОНА»**

В 1961 году на Всемирном биохимическом конгрессе в Москве выступал с пленарной лекцией американец Д. Грин. Я слушал доклад со всевозрастающим волнением. Казалось, еще шаг, и группа Грина в Мэдисоне решит проблему превращения энергии при дыхании и фотосинтезе.

— Эту работу мы закончим к следующему конгрессу, — пообещал докладчик.

Можно ли сомневаться в его успехе?

Профессор Грин — блестящий специалист по окислительным ферментам. Ферментные комплексы, названные его именем, — излюбленный объект биоэнергетиков. Грин возглавляет институт энзимологии в университете штата Висконсин, славящийся своим сказочно дорогим оборудованием и неправдоподобными масштабами работы. Там рядами стоят десятки ультрацентрифуг, там за один день перерабатывают сотни килограммов бычьих сердец, за которыми будто бы посылают на чикагские боины специальный самолет!

Прошло три года. Вновь конгресс биохимиков. Председательствующий Э. Слейтер дает Дж. Уэбстеру слово для внеочередного сообщения чрезвычайной важности. Уэбстер — правая рука Грина. Должно быть, Грин выполнил свое обещание? Так и есть: Уэбстер сообщает об успехе решающего эксперимента.

Это торжество Грина и, казалось бы, хороший повод для других биоэнергетиков сменить тему. Но стоит ли спешить, особенно если вы, подобно Э. Ракеру из Корнелльского университета, что в Итаке, посвятили биоэнергетике не один год жизни?

Ракер решает повторить опыты Уэбстера и сразу же, в самом начале работы, обнаруживает несоответствие: один из белков в Итаке движется на электрофограмме не так, как в Мэдисоне. Ракер звонит Грину, чтобы поделиться своими сомнениями. Тот и слушать не хочет: какие там еще несоответствия?

— Мой Уэбстер прав, и точка!

Ракер заде́т за живое: своим гла́зам он верит больше, чем всей армии гриновских сотрудников.

И вот Ракер в Мэдисоне. Грин продолжает упорствовать. Ракер просит показать ему электрофореграмму. Грин посылает за Уэбстером. Тот появляется и, узнав о причине вызова к шефу, уходит в соседнее здание за протоколами опытов... Уходит и не возвращается. Более того, профессор Уэбстер исчезает! Его не могут разыскать ни в лаборатории, ни дома, ни у коллег по институту.

Грин в замешательстве. В конце концов и без помощи Уэбстера он находит протоколы и шаг за шагом проверяет результаты опытов. И тут всплывает чудовищный факт: в решающем измерении радиоактивности, когда определялось включение меченого фосфата в органическую фракцию, налицо явный разброс данных. При этом в опытных пробах (где ожидали включение фосфата) дальнейший расчет ведется по максимальным величинам, а в контроле (где такого включения быть не должно) по минимальным. Разность тех и других величин записывается в итог опыта и преподносится как его окончательный результат.

...Спустя месяц Уэбстер объявится в другом конце США, в Майами, и напишет Грину невразумительное письмо в свое оправдание, а еще через несколько недель Грин сделает сообщение на съезде американских биохимиков и разошлет его текст своим вчерашним конкурентам — биоэнергетикам. Название доклада «О вкладе Джорджа Уэбстера в изучение дыхательного фосфорилирования». Это чистосердечное признание в невольном обмане, на который толкнул его сотрудник-фальсификатор.

Но раскаяние не спасет профессора Грина. С тех пор ни один серьезный журнал не примет его статьи, и Грин будет публиковаться только в трудах Национальной академии наук (США), где он как академик защищен от критики рецензентов.

Казалось бы, жестокий и наглядный урок! Однако, как это ни удивительно, история Грина и Уэбстера повторяется спустя несколько лет. На сей раз другой почтенный биоэнергетик становится жертвой недобросовестности своей аспирантки, пытавшейся провести все тот же «роковой» эксперимент с включением фосфата.

Не подумайте, что биоэнергетика богаче проходимцами, чем любая другая наука. Чтобы убедиться в этом, достаточно прочесть, например, статью А. Лука «Плутство в науке и облик ученого» в Вестнике АН СССР за 1980 год (№ 1). Приведу только один случай, описанный автором.

«В непрекращающемся жарком споре о том, наследуется ли талант, сторонники гипотезы наследственной одаренности обильно ссылались на работу по этим проблемам английского психолога С. Барта. Противник этой гипотезы американец Л. Камин, усомнившись в некоторых данных Барта, отправился за океан для изучения протоколов и архивных материалов. Однако никаких материалов он не обнаружил. Более того, оказалось, что Барт сфабриковал свои данные и подтасовал цифры, которые впоследствии перекочевывали из одной статьи в другую. Несколько позже обнаружилось, что два автора, которые одобрительно цитировали работу Барта в своих статьях на страницах редактируемого Бартом журнала и которых он, в свою очередь, цитировал в подтверждение собственных взглядов, на самом деле были плодом его воображения».

Выдумать не только факты, но еще и коллег, подтвердивших несуществующие наблюдения! Да, это, по-видимому, вершина научного плутства!

Что же касается Грина, то он, быть может, пал жертвой «закона Паркинсона», который гласит: «Успех в научной работе порождает такое увеличение ее финансирования, что дальнейшее продолжение работы становится невозможным». Честь выступать с пленарным докладом на всемирном биохимическом конгрессе Грин заслужил работами, выполненными им самим и небольшой группой тщательно отобранных молодых сотрудников-энтузиастов. Шеренги ультрацентрифуг, самолет для бычьих сердец, армия случайных людей, чтобы обслуживать громоздкую технику, — все это пришло позже как следствие уже достигнутых успехов. Видимо, в какой-то момент Грин не совладал со свалившимся на него богатством.

Однако вряд ли его трагедию можно объяснить одним только «законом Паркинсона». Ведь в 1965 году, когда произошли описанные здесь события, Грин был уже давно сложившимся ученым с большим опытом руководства научным коллективом. И тем не менее он по-

пался на удочку проходимца, которому, кстати говоря, выплачивали огромную зарплату, одну из самых высоких в институте.

Причину случившегося нам нужно искать в той ситуации, которая сложилась к этому времени в биоэнергетике.

В развитии каждой науки когда-то наступает звездный час, приближение которого лихорадит даже самые холодные и расчетливые умы. Так произошло с биоэнергетикой в 60-е годы.

В те времена звездный час переживали молекулярные биологи. Уже открыли двойную спираль ДНК. Шумно отпраздновали победу над тайной генетического кода. Расшифровали пространственную структуру первых ферментов. А вот биоэнергетики, не уступавшие «нуклеинщикам» и энзимологам в своих честолюбивых мечтах, все еще не могли ответить на вопрос, каким таким образом живая клетка обеспечивает себя необходимой энергией.

Такая ситуация казалась тем более странной, что давно уже были налицо все предпосылки решения этой проблемы. Стало ясно, какими энергетическими ресурсами пользуются те или иные живые существа. Были найдены и получены в чистом виде ферменты, усваивающие эти ресурсы. Не составило большого труда определить, в каких частях клетки происходят энергетические превращения. Однако сам принцип, на котором базируется действие основных биологических преобразователей энергии, остался неясным, как и прежде.

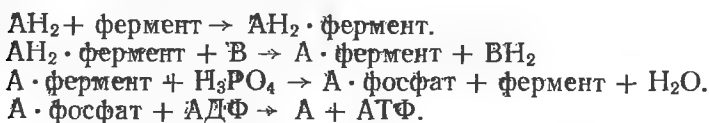
ЛОЖНАЯ АНАЛОГИЯ

Как мы уже знаем из предыдущих глав, живая клетка превращает энергетические ресурсы, например пищу, в такие вещества, которые могут быть окислены определенным ферментом. При окислении вещество (назовем его AH_2) теряет электроны и протоны, которые присоединяются к другому, восстанавливаемому веществу (В). Выделяющаяся при окислительной реакции энергия используется для синтеза АТФ путем соединения неорганического фосфата с АДФ:





Невероятно, чтобы такая химическая реакция происходила в одну стадию — это потребовало бы одновременного взаимодействия всех четырех веществ, написанных в левой части уравнения. Поэтому приходится предположить, что процесс протекает с участием фермента в несколько этапов. Например:



Именно так образуется АТФ при брожении или гликолизе, «подсобных» механизмах энергообеспечения, включающихся в условиях нехватки основных энергетических ресурсов: у растений — света, у животных и бактерий — кислорода или окисляемых кислородом веществ.

В общем-то неудивительно, что механизм образования АТФ при дыхании и фотосинтезе вначале стремились объяснить по аналогии с уже изученными к тому времени брожением и тликолизом. Казалось, замени бродильный фермент на дыхательный или фотосинтетический, и та же система реакций будет образовывать АТФ за счет световых квантов или питательных веществ, сжигаемых кислородом.

Эта точка зрения, названная «химической схемой», стала общепринятой концепцией биоэнергетики в 50—60-е годы. В ее основу были положены хорошо известные факты, свидетельствовавшие о ключевой роли окислительных ферментов в дыхательном и фотосинтетическом синтезе АТФ. Но что это за роль?

Казалось бы, ясно: катализ окислительных реакций и их сопряжение с синтезом АТФ. Поэтому во многих лабораториях предпринимались отчаянные усилия заставить ферменты дыхания и фотосинтеза реагировать с АДФ и фосфатом, как того требовала схема.

Биоэнергетики шли дорогой, уже пройденной при изучении брожения. Сперва разрушали клетку, потом из множества внутриклеточных ферментов выделяли тот, который катализировал нужную окислительную реакцию. И наконец, к раствору очищенного фермента добавляли восстановитель, окислитель, АДФ и фосфат и смотрели, не получится ли АТФ.

Так вот, АТФ не получался!

Напрасно искусные экспериментаторы составляли всевозможные смеси белков, субстратов и солей, варьируя до бесконечности условия проведения реакции. С легкостью удавалось воспроизвести в пробирке окислительный процесс, но освобождающаяся энергия превращалась в тепло, вместо того чтобы использоваться для синтеза АТФ. Сообщения о синтезе АТФ в растворе дыхательных ферментов всегда оказывались в конце концов случайной ошибкой или преднамеренной фальсификацией, как это было, например, с Уэбстером.

В то же время более сложные системы, сохранявшие черты надмолекулярной организации биологических объектов: кусочки тканей, клетки, митохондрии и хлоропласты — или даже образующиеся при их разрушении ультразвуком мельчайшие пузырьки, окруженные мембраной, — все они в определенных условиях образовывали АТФ. Но стоило изменить условия, и даже на этих сложных объектах дыхание утрачивало связь с синтезом АТФ.

Уже первые исследователи дыхательного синтеза АТФ обратили внимание на ту необычайную легкость, с которой фосфорилирование ускользает, а дыхание переключается на «холостой ход». Сопряжением дыхания с фосфорилированием обнаружил Владимир Александров-

вич Энгельгардт в 1930 году. А спустя несколько лет другой Владимир Александрович, Белицер, описал условия, когда дыхание отключалось от фосфорилирования и протекало без образования АТФ, несмотря на высокую скорость окислительной реакции. Так было открыто явление, названное разобщением дыхания и фосфорилирования. Именно этот факт оказался камнем преткновения для химической схемы биоэнергетики.

ПАРАДОКС ВЕЩЕСТВ-РАЗОБЩИТЕЛЕЙ

Тот факт, что окисление может быть отключено от фосфорилирования, впервые описан при изучении брожения. Если сбраживать сахар в среде, где фосфат (H_3PO_4) заменен на арсенат (H_3AsO_4), то брожение идет с большей скоростью, но без образования АТФ. Подобным образом действует арсенат и на дыхание: в присутствии арсената система дыхания перестает запасать энергию в форме АТФ. Именно арсенат был первым разобщителем дыхания и фосфорилирования в опытах В. Белицера. Казалось бы, это наблюдение лишь подчеркнуло еще раз сходство механизмов дыхания и брожения, чего и требовала химическая схема.

Осложнения начались с 1948 года, когда Ф. Липман неожиданно обнаружил, что дыхание разобщается и таким веществом, как динитрофенол, причем его требуется гораздо меньше, чем арсената. В отличие от арсената динитрофенол совсем непохож на фосфат. Фермент может принять арсенат за фосфат, но чтобы он перепутал фосфат с динитрофенолом?.. Кстати, динитрофенол не действовал на брожение, и это могло бы зародить сомнения в сходстве механизмов дыхательной и бродильной энергетики.

Несколько лет эффект Липмана считали одним из курьезов, которыми не так уж бедна биохимия. Однако затем последовали наблюдения, показавшие, что разобщить дыхание и синтез АТФ можно не только динитрофенолом, но и салициловой кислотой, дикумаролом, перфторпинаколом, производными бензимидазола и фенилгидразона.

...Теперь, рассказывая студентам историю о разобщителях, я пишу формулы этих веществ на доске в конце первого часа лекции и предлагаю подумать о том, что же роднит разобщители между собой и почему все они одинаково действуют на дыхание?

Наиболее смышленным хватает пятнадцати минут непрерыва, чтобы найти правильный ответ: все разобидители способны переносить протоны через мембрану. Науке для этого потребовалось больше пятнадцати лет. От частного в общем-то вопроса о действии веществ разобидителей биоэнергетики пришли к одному из крупнейших открытий современной биологии.

МИТЧЕЛ И ЕГО ДОГАДКА

НАЧАЛО ПУТИ

Однажды, просматривая в библиотеке биофака новые журналы, я наткнулся на короткую статью в «Нэйчер» под названием «Сопряжение окисления и фосфорилирования механизмом хемиосмотического типа». Автор П. Митчел — новое имя в биоэнергетике. И термин «хемиосмотический» тоже новый. Новое имя, новое слово и небывалый, смахивающий на фантазию подход к старой проблеме.

...Пройдут годы, и заметка в журнале «Нэйчер» за 1961 год станет самой цитируемой работой по биоэнергетике, а ее автор — лауреатом Нобелевской премии, присужденной вопреки традициям этих премий, не за открытие какого-то нового явления, а за догадку о его существовании.

Питер Денис Митчел родился 29 сентября 1920 года в Митчепе (графство Суррей, Англия). Сын лейтенанта британской армии был отдан родителями в Тонтонский королевский колледж. Затем он студент колледжа Иисуса в Кембриджском университете. В 1943 году выпускник университета, бакалавр искусств.

В том же году Митчел начинает работать над диссертацией под руководством профессора Д. Даниэлли. Еще в 30-е годы Даниэлли прославился как автор изящной концепции о молекулярном строении биологических мембран. После отъезда Даниэлли из Кембриджа Митчел переходит в группу по изучению ферментов, которую возглавлял известнейший энзимолог М. Диксон (энзимология — наука о ферментах).

Чтобы стать кандидатом наук (в Англии это называется «доктор философии»), Митчелу потребовалось семь лет. Вторую диссертацию — на звание доктора наук — он так и не защищал, шагнув в 1974 году сразу в члены Королевского общества.

Студентом Митчелу довелось слушать лекции Д. Флеминга. Это было время, когда из английских госпиталей выходили фронтовики, чью жизнь спас Флемингов пенициллин. И в общем-то неудивительно, что темой своей первой научной работы молодой био-

лог выбрал механизм действия пенициллина на бактерии.

Сначала было исследовано включение меченого фосфата в нуклеиновые кислоты. Пенициллин тормозил этот процесс. В столь сложной системе, как живая клетка, такой эффект мог объясняться либо прямым действием пенициллина на синтез нуклеиновых кислот, либо влиянием на какой-то отдаленный этап обмена веществ, либо на клеточную стенку и перенос фосфата из среды в клетку. Именно тогда Митчел впервые уловил притягательную силу тайны, окружавшей роль фосфата в энергетике живых существ.

Но пройдут годы, прежде чем он вплотную займется этой проблемой. Пять лет после защиты диссертации Митчел работает демонстратором на кафедре биохимии Кембриджского университета, а затем его приглашают старшим преподавателем на кафедру зоологии в Эдинбург. В течение следующих восьми лет, проведенных здесь, в Шотландии, он мало печатается, не спешит с продолжением опытов по действию пенициллина. Постепенно он приходит к убеждению, что история с пенициллином всего лишь частный случай, за которым стоят куда более сложные вопросы.

Митчел как-то издалека, медленно, исподволь приближается к основной проблеме биоэнергетики. Сначала мысль о том, нельзя ли отнести пенициллин к загадочным разобщителям, благо в эту группу попадают самые разные по строению вещества. Казалось бы, взять да поставить опыт вроде того, что описал Ф. Липман еще в 1948 году! Но далеко ли он продвинется вперед, если даже докажет, что пенициллин действительно разобщитель?

Одним разобщителем больше — невелико открытие! Не лучше ли поразмыслить над тем, что такое вообще разобщение дыхания и фосфорилирования? Ясно, что здесь дело в каком-то нарушении механизма, сопрягающего эти два процесса. А что это за сопрягающий механизм?

Митчел внимательно анализирует бытовавшие в то время взгляды на природу дыхательного фосфорилирования. Казалось бы, ему, биохимику, должна импонировать химическая схема сопряжения, объяснявшая энергетику дыхания наподобие уже известной энергети-

ки брожения. Но как объяснить действие разобщителей?

Интуиция энзимолога (недаром Диксон — один из его учителей!) подсказала Митчелу, что динитрофенол и вся разномаястная группа разобщителей не могут быть аналогами фосфата. Ферменты слишком разборчивы к объектам своей деятельности — субстратам, чтобы ошибаться так грубо.

Но что, если разобщители действуют не на фермент, а на его окружение?

Дыхательные ферменты отличаются от ферментов брожения тем, что они не плавают в клеточном соке, а прикреплены к мембранам. Так, может быть, именно мембрану и атакуют разобщители? Но зачем нужна мембрана ферментам вообще и дыхательным ферментам в частности? Вот вопрос, которым занялся Митчел, вспомнив беседы с другим своим наставником — Даниэлли, основателем учения о мембранах.

До Митчела биохимики, изучавшие мембранные ферменты, рассматривали мембрану как штатив, к которому эти ферменты крепятся. Считалось, что ферментативные процессы развертываются на поверхности, а не в «толще» мембраны. Такое мнение основывалось на факте, что субстраты ферментов — это, как правило, водорастворимые вещества. Казалось бы, они не должны проникать в сердцевину мембраны, сделанную из жира.

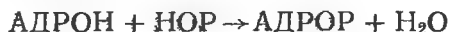
Однако для целой группы процессов транспорта веществ было с несомненностью установлено, что водорастворимые соединения проходят каким-то образом через жировой барьер мембраны внутрь клетки. Если, допустим, глюкоза, вообще нерастворимая в жирах, переносится через внешнюю мембрану клетки (а это факт!), почему бы не предположить, что она может быть атакована каким-то из мембранных ферментов прямо в мембране?

До Митчела химическими превращениями в мембранах практически не занимались. Изучение транспорта веществ через мембраны оставалось уделом физиологов-«транспортников». Биохимики рассматривали мембрану как помеху, от которой следует поскорее избавиться, чтобы перевести исследуемый фермент в раствор и там уже заняться им вплотную, используя весь арсенал энзимологии.

Столкнувшись с проблемами биоэнергетики, Митчел был поражен отсутствием каких бы то ни было контактов биохимиков с «транспортниками». Между ними лежала пропасть. И он занялся наведением мостов.

ЧИСТО УМОЗРИТЕЛЬНОЕ ПОСТРОЕНИЕ

Итак, перед нами задача: сопрячь процесс дыхания с образованием АТФ, используя каким-то образом свойства мембраны. Давайте рассмотрим еще раз реакцию синтеза АТФ:



Молекула H_2O при образовании АТФ, обозначенного здесь АДРОР (буквами Р показаны атомы фосфора), может получиться из остатка гидроксила (OH^-), отщепляемого от неорганической фосфорной кислоты (обозначенной НОР), и иона водорода, или протона (H^+), взятого от аденозиндифосфата (АДРОН).

Вода — продукт не только синтеза АТФ, но и дыхания, которое, как мы уже знаем, формально описывается реакцией взрыва гремучего газа:

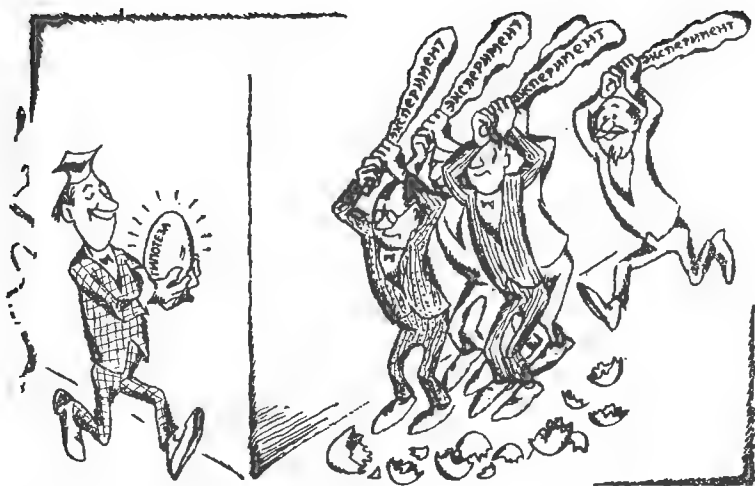


с той разницей, что в процессе участвует не молекулярный водород, а органические вещества — субстраты дыхания, поставляющие атомы водорода для образования воды.

Если две реакции, образующие общий продукт, протекают в одной пробирке, то они в конце концов могут лишь замедлить друг друга. В то же время наша цель: объяснить, почему дыхание активирует, увлекает за собой реакцию фосфорилирования аденозиндифосфата неорганической фосфорной кислотой. Итак, введя в поле нашего зрения воду, мы все еще не продвинулись к цели.

Впрочем, не совсем так. Появилась маленькая зацепка, ниточка, потянув за которую, можно попытаться распутать клубок.

Нам нужно, чтобы дыхание влияло на фосфорилирование, и эта цель достигнута: влияние уже есть. Беда в том, что оно направлено не в ту сторону, куда хотелось бы: дыхание затрудняет реакцию фосфорилиро-



вания вместо того, чтобы облегчать ее. Но ведь мы не учли еще один неперенный компонент системы — мембрану. Плохо, если вода, образующаяся при дыхании, и вода, образующаяся при синтезе АТФ, выделяются по одну и ту же сторону от мембраны, то есть в один и тот же отсек. Это равносильно протеканию двух реакций в одной пробирке. А что, если два процесса образуют воду по разные стороны от мембраны?

Тогда дыхание будет создавать избыток воды, образуя ее, например, слева от мембраны.

Допустим теперь, что синтез АТФ приводит к выделению воды справа от мембраны. Создается ситуация, когда синтез АТФ как бы компенсирует нехватку воды справа относительно возросшей (из-за дыхания) «концентрации воды» слева. Тем самым, в принципе говоря, тормозящее влияние дыхания на фосфорилирование должно смениться благоприятным эффектом: дыхание создает избыток продукта (воды) по одну сторону мембраны, а фосфорилирование уравнивает количества воды в двух отсеках, образуя воду по другую сторону мембраны. Таким образом, дыхание повышает вероятность реакции синтеза АТФ. Другими словами, дыхание сопрягается с фосфорилированием. Наконец-то!

Гипотеза всегда основывается на предположениях. Она может быть отвергнута, если хотя бы одно из предположений противоречит уже известным фактам.

Нет ли таких противоречий в «водной» гипотезе сопряжения?

К сожалению, есть. В предложенной схеме дыхание образует, а фосфорилирование нивелирует различие в количестве воды в двух отсеках, разделенных мембраной. Чтобы такая система работала, мембрана должна быть непроницаемой для воды. Если не выполнено это условие, избыток воды, образуемой слева от мембраны за счет дыхания, «утечет» на другую ее сторону, где воды меньше. В результате там количество воды повысится без всякого фосфорилирования, и энергия, выделившаяся при дыхании, будет безвозвратно потеряна.

Так вот, давно известно, что биологические мембраны проницаемы для воды. Они вообще не могут служить барьером для таких маленьких нейтральных молекул, как H_2O . Умозрительное построение «водной гипотезы» рушится!

Но может быть, из тех же блоков удастся создать что-нибудь более устойчивое?

ХЕМИОСМОТИЧЕСКАЯ ГИПОТЕЗА

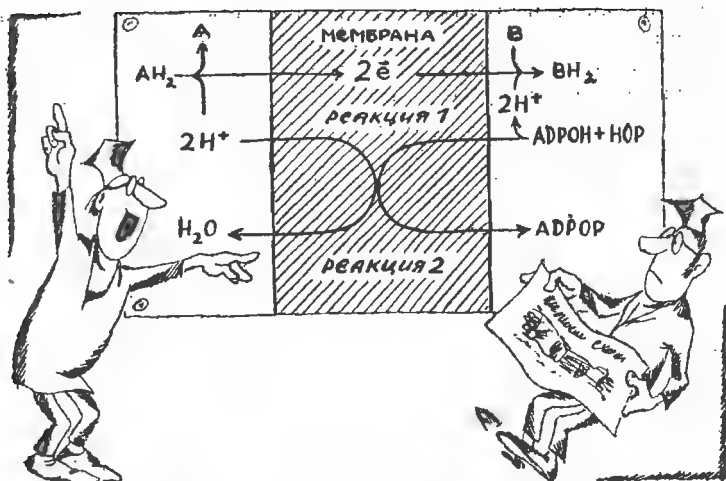
На чем же мы споткнулись?

На том, что мембраны — негодный барьер для воды, продукта дыхания и фосфорилирования. Но из чего получается вода, например, при фосфорилировании? Из иона водорода (H^+), отнятого от АДФ, и гидроксила (OH^-), отнятого от фосфата. Так ведь H^+ и OH^- — заряженные частицы, ионы, а для ионов мембраны, как правило, практически непроницаемы!

Итак, нам нужно, чтобы при синтезе АТФ получались не вода, а ионы H^+ и OH^- , да еще по разные стороны мембраны.

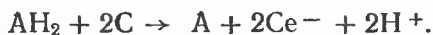
Если бы теперь дыхание тоже образовывало не воду, а H^+ и OH^- , то можно было бы так расположить ферменты в мембране, чтобы при дыхании ион H^+ выделялся слева от мембраны, а при фосфорилировании — справа от нее. Тогда окажется, что дыхание образует слева от мембраны кислоту, справа — щелочь, а процесс фосфорилирования просто-напросто нейтрализует кислоту и щелочь.

Таким образом, реакция нейтрализации кислоты и щелочи, образованных дыханием, станет движущей силой процесса синтеза АТФ.



Чтобы завершить строительство «интеллектуального собора», остается лишь догадаться, как именно дыхание образует кислоту и щелочь.

Известно, что окисление субстратов дыхания кислородом катализируется дыхательными ферментами. Они бывают двух типов. Одни присоединяют атомы водорода, другие присоединяют электроны. Если окислить донор водорода (AH_2) ферментом — акцептором электронов (C), то одним из продуктов реакции окажутся ионы H^+ :



Если теперь восстановить кислород посредством Ce^- , то произойдет потребление ионов H^+ :



Вот мы и свели концы с концами!

Такова хемиосмотическая гипотеза Митчела. Она схематично изображена на рисунке.

Окисление субстрата AH_2 (реакция 1) ферментом — акцептором электронов, который не указан, чтобы не усложнять схему, происходит на левой поверхности мембраны. В результате электроны присоединяются к ферменту, а протоны уходят в воду.

Затем электроны переносятся ферментом на правую сторону мембраны и там восстанавливают молекулярный кислород или какой-нибудь другой акцептор водорода (в общей форме обозначен буквой В). Вещество В, присоединив электроны, связывает ионы H^+ справа от мембраны, превращаясь в $ВН_2$.

Синтез АТФ (реакция 2) происходит таким образом, что два иона H^+ отщепляются от АДФ и фосфата справа от мембраны, компенсируя потерю двух H^+ при восстановлении вещества В. Один из кислородных атомов фосфата переносится на другую сторону мембраны и, присоединив два иона H^+ из левого отсека, образует H_2O . Остаток фосфорила присоединяется к АДФ, давая АТФ.

По схеме Митчела, показанной на рисунке, роль дыхания в синтезе АТФ ограничивается созданием избытка H^+ на одной стороне мембраны по сравнению с другой ее стороной. Дыхание как бы сгущает, концентрирует ионы H^+ в одном из двух отсеков системы, разделенных мембраной. Это означает, что оно совершает осмотическую работу. Затем осмотическая энергия, накопленная в виде разности концентраций ионов H^+ между левым и правым отсеками, расходуется на химическую работу, то есть на синтез АТФ.

Вот почему Митчел назвал свою схему «хемиосмотической гипотезой». Она выгодно отличается от старой, «химической» схемы, приведенной на странице 36, по крайней мере в одном своем аспекте. Митчел обошелся без неуловимых промежуточных продуктов вроде $АН_2 \cdot$ фермент, $A \cdot$ фермент и $A \cdot$ фосфат. Ему вообще не нужны были какие-либо специальные продукты, общие для реакций дыхания и фосфорилирования. По Митчелу, связующим звеном двух процессов служат водородные ионы.

Итак, хемиосмотическая гипотеза освободилась от одного из недостатков старых схем. В то же время она объяснила два ранее непонятных момента: необходимость мембран и механизм действия веществ-разобщителей.

Совершенно очевидно, что устройство, придуманное Митчелом, нуждается в двух пространствах, разделенных мембраной, непроницаемой для ионов H^+ и $ОН^-$. Любое нарушение изолирующих свойств мембраны, например повышение ее проницаемости для H^+ , то есть

протонной проводимости, должно подавлять процесс синтеза АТФ. Что касается дыхания, то при повышении проводимости оно ускорится, так как перенос водорода и электронов, уже не приводящий к накоплению энергии, «покатится под гору», превращая всю энергию дыхания в тепло.

Так ведь это же и есть разобщение дыхания и фосфорилирования: тот самый феномен, над объяснением которого бились авторы «химических» гипотез, заставляя динитрофенол уподобиться фосфату в реакции с ферментом!

Митчел обратил внимание на то, что все разобщители — растворимые в жирах слабые кислоты, имеющие в своем составе обратимо связывающийся протон. Так возникло предположение, что разобщители служат переносчиками протонов через мембрану. Они связывают H^+ на той ее стороне, где дыхание создает избыток ионов водорода, затем диффундируют, неся лишний протон, через мембрану, и освобождают H^+ в противоположном отсеке, где водородные ионы в дефиците.

КОРНИ ГИПОТЕЗЫ

Пожалуй, только два факта (оба негативного свойства!)

были положены Митчелом в основу его гипотезы в далеком уже 1961 году. Это невозможность найти химические продукты, которые были бы общими для дыхания и фосфорилирования, и необъяснимость роли мембран и действия разобщителей в рамках традиционных представлений, почерпнутых из аналогии с брожением.

Однако было бы ошибочным полагать, что хемиосмотическая гипотеза возникла совсем уж на пустом месте. Еще в 1945 году швед Г. Лундегард писал о возможности образования кислоты и щелочи мембранными окислительными ферментами. Лундегард был первым, кто «уложил» дыхательный фермент поперек мембраны, увидев в этом механизм концентрирования ионов. В 40-е годы эту гипотетическую концепцию подхватили И. Конвей и Т. Брейди, стремившиеся таким способом объяснить механизм образования кислоты в желудке. В начале 50-х годов ту же мысль обсуждали в Англии Р. Деви, А. Огстон и Г. Кребс (тот самый Кребс, имя которого увековечено на карте обмена веществ в связи с циклом карбоновых кислот). В 1960 го-

ду известный биохимик Р. Робертсон, избранный впоследствии президентом Академии наук Австралии, писал о разделении зарядов как о первичной стадии получения энергии, необходимой для синтеза АТФ.

Однако все эти предположения существовали сами по себе, разрозненно, их авторы не пытались создать единую схему, признанную объяснить механизм превращения энергии в митохондриях. Выдвинув гипотезу о разделении H^+ и OH^- при синтезе АТФ, Митчел заполнил недостающее звено, замкнул «протонный цикл» и создал непротиворечивую концепцию, позволяющую понять природу сопряжения между дыханием и фосфорилированием.

ОДНА ИЗ МНОГИХ ГИПОТЕЗ

В 1961 году схема Митчела в краткой форме была тотчас напечатана журналом «Нейчер» (трудности с публикациями возникнут позже!).

Новую концепцию восприняли первоначально как еще одно умозрительное предположение в длинном ряду биоэнергетических гипотез. В начале 60-х годов была большая мода на эти гипотезы. Поскольку речь шла о главных системах энергообеспечения живых клеток, ясно было, что победителя ждет хороший приз, и каждый уважающий себя биоэнергетик спешил выдвинуть собственную схему энергетического сопряжения. Гипотезы возникли и, не выдержав испытания опытом, гибли, чтобы уступить место новым предположениям.

Некоторые из них казались столь фантастичными, что не удостоивались проверки: никто не спешил вкушать сомнительного вида плод, и он, перезрев, падал и исчезал в «быстром и мутном потоке информации». Это случалось прежде всего тогда, когда сам автор гипотезы не делал попытки проверить предсказательную силу своих постулатов.

Поначалу казалось, что такая судьба уготована и хемиосмотической теории. Шли годы, а Митчел все молчал. Прошел даже слух, что он вовсе удалился от дел.

ГЛИНН ХАУЗ. ОСЛЫ И ДЕТИ

Митчел действительно не ставил опыты по проверке своей концепции. Вскоре после первой публикации гипотезы он тяжело заболел и решил оставить работу в университете, с начальством которого у него всегда

были нелады. Он покинул Эдинбург и на деньги, только что полученные по наследству, купил ферму на самом юге Англии, в медвежьем (по английским понятиям) углу, в нескольких милях от маленького городка Бодмин, графство Корнуэлл. Эти места известны нам по Конан Дойлу («Собака Баскервиллей»): Бодмин расположен чуть к югу от тех мрачных болот, где произошли захватывающие события с участием Шерлока Холмса. Научных учреждений в этих краях нет, зато сохранились легенды о пиратах, избравших окрестности Бодмина местом своего последнего прибежища на английских островах.

Прежний владелец фермы, получив причитающуюся ему сумму, поспешил удалиться, оставив Митчелу стадо коров, которых доктор философии вынужден был доить собственноручно, чтобы предотвратить их страдания.

На территории фермы находились развалины старинного дома, принадлежавшего во времена наполеоновских войн британскому адмиралу. Как показали раскопки, под адмиральским домом были погребены еще более древние развалины каменного строения, где жило когда-то семейство некоего Глинна, начавшего платить подати королю чуть ли не тысячу лет тому назад.

Митчел решил восстановить дом адмирала, а заодно и дом Глинна, заключенный в его недрах. Были приглашены архитектор и бригадир строителей, с которыми Митчел немедленно рассорился. Других в Бодмине достать было непросто, и хозяин решил сам взяться за постройку. Он нанял двух каменщиков.

— Чудесные простые люди, — рассказывал мне Митчел, — жаль только, что один из них совершенно неожиданно оказался беглым каторжником, осужденным за убийство!

Когда полиция заинтересовалась одним из новых его коллег, Митчелу пришлось сколачивать другую артель. Эта задача была не без труда решена, и на склоне холма у живописной речки Фой стали помаленьку вырисовываться очертания двухэтажного дома с дорическими колоннами вдоль фасада.

Здоровье Митчела пошло на поправку. Причиной тому была смена занятий, образа жизни и климата, а также, по-видимому, аскорбиновая кислота, которую он принимал в огромных количествах, следуя рецепту

Л. Полинга (довольно редкий случай, когда один нобелевский лауреат по химии излечил другого, будущего нобелевского лауреата по химии).

Обосновавшись на новом месте и выздоровев, Митчел завел двух ослов — животных, которые, как он однажды мне признался, вызывают у него наибольшую симпатию. Других ослов в графстве Корнуэлл не было. По утрам Митчел запрягал одного из них в коляску и вез своих многочисленных детей в школу («Чтобы школа, — как говорил он, — не вызывала у детей слишком уж большой неприязни»). Затем отправлялся на ферму (в его руках она оказалась выгодным предприятием) или разъезжал по окрестностям в поисках развалившихся замков. Их восстановление стало новой страстью Митчела. Вплоть до недавнего времени один день в неделю он посвящал архитектурному надзору за возрождением какого-либо утраченного шедевра старинной архитектуры в Корнуэлле.

ПОРАЖЕНИЯ И ПОБЕДЫ

«ГЛИННОВСКИЕ ЛАБОРАТОРИИ»

Мир в Глинн Хаузе был взорван, когда однажды Митчел решил просмотреть пачку научных журналов за последние два-три года. С надеждой листал он страницы многочисленных статей по биоэнергетике. Что стало с его гипотезой? Быть может, получены факты, ее подтверждавшие? Или она опровергнута? Нет, хуже. Она не замечена.

Ах так! Митчел немедленно берется за организацию лаборатории, чтобы поставить опыты и проверить свою догадку. Он сразу же отказался от мысли вернуться в Эдинбург или любой другой город. Хватит с него тамошнего начальства и воздуха, отравленного автомобилями (еще один штрих к портрету: Митчел с одним из сыновей конструировал электромобиль). Лаборатория должна быть здесь, в Глинн Хаузе. Его собственная лаборатория — предприятие, независимое от всякой научной и ненаучной бюрократии.

А деньги? Что же, можно построить коттеджи и сдавать их дачникам. Кроме того, есть еще и доход от фермы! Но захочет ли кто-нибудь поехать в такую глушь, чтобы помочь ему в экспериментах? Посмотрим, не откликнется ли «старая гвардия», сотрудники его давно распавшейся группы в Эдинбурге.

Откликнулась Дж. Мойл. Пройдет несколько лет, и это имя прославится среди биоэнергетиков, но пока Мойл — безвестная и единственная соратница Митчела в его начинании. Нет слов, как благодарен он ей. И во вновь основанном научном предприятии под громким названием «Глинновские лаборатории для стимулирования фундаментальных биологических исследований» Митчел решает иметь двух директоров: это Мойл и он сам. Не беда, что директоров двое, а в их подчинении только один лаборант. Самоотверженность должна быть вознаграждена, и немедленно! Так Мойл стала директором.

Для лаборатории, размещенной в нескольких комнатах на первом этаже Глинн Хауза, Митчел закупил са-



мое необходимое — центрифугу, полярограф, счетчик изотопов, реактивы. И начались опыты.

ПЕРВЫЕ ОПЫТЫ МИТЧЕЛА И МОЙЛ

Митчел взялся за то, что было доступно при его более чем скромном оборудовании и, мягко говоря, не совсем укомплектованном штате.

Гипотеза предсказывала, что дыхание должно образовывать по одну сторону от мембраны кислоту, а по другую — щелочь. Так давайте в процессе дыхания мерить кислотность среды, благо для этого не требуется ничего, кроме рН-метра — простенького прибора, состоящего из пары электродов и вольтметра.

Из печени белых крыс выделяли митохондрии, помещали их в бескислородные условия, а затем начинали реакцию окисления добавкой кислорода. Не изменится ли кислотность среды, в которой инкубируются митохондрии?

Первые опыты — первые неудачи. Но, может быть, рН-метр слишком груб, чтобы почувствовать небольшие сдвиги в концентрации H^+ ионов? Митчел становится стеклодувом и конструирует изящную ячейку совсем маленького объема и очень чувствительный электрод.

Вновь опыт с добавкой кислорода... Есть! Прибор регистрирует изменение рН. Среда закисляется. А что, если добавить вместо кислорода АТФ?

Снова закисление! Именно этого можно было ожидать, если бы АТФ расщеплялся той системой, которая в присутствии кислорода синтезирует АТФ.

Митчел и Мойл направляют в «Нэйчер» краткое сообщение, что их опыты подтверждают хемиосмотическую гипотезу.

«ВАРШАВСКАЯ БИТВА». ПОРАЖЕНИЕ

Апрель 1966 года. Варшава. Европейский съезд биохимиков. Англичанин Б. Чэпел

рассказывает о своих опытах с фосфолипидными мицеллами — полыми внутри сферическими частицами, стенки которых сделаны из жироподобных веществ, полученных из биомембран.

Оказывается, мицеллы отвечают на добавки веществ-разобщителей и антибиотика валиномицина точно такими же изменениями концентрации ионов калия и водорода, как митохондрии в опытах Митчела и Мойл. Стало быть, разобщители и валиномицин атакуют липидный компонент системы, а не белки-ферменты: в мицеллах ферментов просто нет. Напомним, что сторонники «химических» схем сопряжения считали мишенью действия разобщителей именно ферменты. Казалось бы, новое подтверждение гипотезы Митчела? Однако Чэпел пока уклоняется от такого вывода.

После съезда австралиец Э. Слейтер и польский биохимик Л. Войчак собирают семинар. Присутствует узкий круг специалистов по энергетике митохондрий. Среди них (впервые!) Митчел. Более того, ему оказана честь председательствовать на одном из заседаний.

Митчел использует вводное слово председателя, чтобы изложить хемиосмотическую концепцию. В поддержку своей гипотезы он приводит полученные с Дж. Мойл данные опытов на рН-метре. Встает Б. Чанс:

— А что будет, если в вашем, доктор Митчел, опыте добавить вещество, связывающее ионы кальция?

— Я так полагаю, что ничего особенного не случится.

— Мы добавили такое вещество, и все ваши изменения кислотности исчезли! Добавили кальций — и они возникли вновь. По-видимому, вы обнаружили какой-то побочный эффект, сопутствующий переносу кальция в митохондрии.



С Митчелом я впервые познакомился в Варшаве, Чанса знал уже пять лет, с Московского международного конгресса биохимиков. Двое спорящих являли собой разительный контраст: англичанин Митчел немного сутулый, с крупной головой и, высоким лбом, редющей шевелюрой чуть вьющихся седеющих волос, вспыльчивый и добродушный, как мистер Пикквик, и Чанс, стройный, подтянутый американец с прямыми, гладко зачесанными назад волосами и жестким взглядом «морского волка» (в свои 54 года он стал чемпионом мира по парусным гонкам). Чанс старше Митчела на восемь лет, но он кажется моложе своего противника, динамичнее и гораздо приспособленней к спору.

Пытаясь опровергнуть Митчела, Чанс применил свою «тяжелую артиллерию» физического эксперимента: прецизионный спектрофотометр для мутных сред, быструю регистрацию параметров в миллисекундной шкале времени и т. д. Митчел мог противопоставить этой новейшей американской технике лишь свой скромный самодельный рН-метр.

Вслед за Чансом Митчела атакуют другие участники семинара.

А что же Чэсел? Он молчит...

Я прошу у Митчела слова. Но тот забыл о своих функциях председателя, смешался и потерял контроль

над собранием. Вновь говорит Чанс. Его слова как приговор несостоявшейся теории:

— Идея фантастична, результаты опытов ясны!

У меня сохранилась фотография: Митчел за кофе в перерыве между заседаниями, сразу после поражения. Рядом Чепел. Митчел что-то доказывает своему собеседнику. Тот, отвернувшись, всем своим видом демонстрирует сомнение.

СЕРЕБРЯНЫЙ ЗВУК ТРУБЫ

Варшавский съезд стал одним из ключевых моментов в моей научной судьбе. После завершения работ по терморегулярному разобщению в мышцах (помните опыт со стриженными голубями?) я понял: чтобы идти вперед, надо знать, как устроен загадочный механизм, сопрягающий дыхание с синтезом АТФ.

Вначале я отдал дань химической схеме. Но опыты, что мы вели с И. Севериной и Ю. Евтодиейко в одном из институтов на улице Вавилова, давали непредсказуемые результаты. Мы обнаружили кое-какие новые эффекты и даже открыли, сами того не желая, сильнейший дыхательный яд, но не приблизились к решению проблемы.

Я жил тогда у Калужской заставы. На моем пути к улице Вавилова был пустырь. Местами из-под песка пробивались зеленые ростки. Я загадал: если за лето пустырь покроется травой, мы на верной дороге. Вернувшись в конце августа из отпуска, я вновь увидел пустырь. По нему гулял ветер, закручивая песчаную пыль в маленькие смерчи. Земля осталась бесплодной.

К весне 1966 года стало ясно, что мы в тупике. В красной папке, где я обычно хранил программы будущих опытов моих сотрудников, впервые появился листок под девизом «План отступления». За мною тогда уже был отдел биоэнергетики в новой лаборатории, только что созданной в МГУ одним из отцов молекулярной биологии, академиком А. Белозерским.

Непросто было преодолеть инерцию. Идут опыты, публикуются статьи, делаются дипломные и аспирантские работы, и вдруг появляется шеф (шеф-то, кстати, без году неделя!) с сообщением, что прежний его план ни к черту, а двигаться нужно совсем в другую сторону...

Я все медлил, откладывал решающий разговор с ребятами в лаборатории и с таким вот настроением поехал в Варшаву. А здесь знакомство с Митчелом, баталия между ним и Чансом и, наконец, сокрушительное поражение Митчела.

Но не это, другое всплывает в памяти прежде всего, когда я вспоминаю Варшавский съезд. Полутемный конференц-зал, огромный экран, и на нем по темному фону белая кривая, неудержимо стремящаяся вниз. Опыт Б. Чэпела. Липидные мицеллы теряют калий, когда к ним добавили динитрофенол и валиномицин.

Выходит, мы три года искали то, что никто не терял! Не умный, всемогущий белок, а глупый липид, от которого только и требуется, что создать белку подходящие условия для его сложной работы, беспомощный, инертный жир — вот в действительности кто главное действующее лицо во всей этой драме под названием «разобщение».

Из Варшавы я отправился в Краков. Поезд пришел поздно вечером. Была темная, влажная весенняя ночь. По улицам прекрасного незнакомого города я отправился искать гостиницу. Вдруг где-то почти над моей головой в черном апрельском небе грянул тревожный серебряный звук трубы и оборвался на полуноте. Это легендарный трубач с башни Марьяцкого собора возвещал о появлении врагов у городских стен и, сраженный вражеской стрелой, умолкал, не допев свою звонкую песню... С тех пор всякий раз, когда я мысленно обращаюсь к весне 1966 года, из недр памяти возникает: белая по черному фону кривая Чэпела и этот трубач на Марьяцком соборе.

ПЕРВАЯ «СЕРАЯ КНИГА» МИТЧЕЛА

Вернувшись в тишину своего Глинн Хауза, Митчел повторил тот опыт, которым сокрушил его в Варшаве Чанс. Напрасно Мойл вглядывалась в показания рН-метра: кислород не вызывал закисления, если в среде было вещество, связывающее кальций. Так что же, Чанс был прав там, в Варшаве? В этом конкретном опыте — да.

Такую гипотезу, как схема Митчела, нельзя доказать, имея в руках один только простейший рН-метр. Но ее нельзя и опровергнуть столь простым способом!



А все-таки при чем тут кальций? Насколько велико в действительности должно быть закисление, если работает дыхательная цепь, закрепленная поперек митохондриальной мембраны?

Митчел садится за письменный стол, а опыты временно препоручает своей верной сотруднице Мойл и лаборанту.

Временно?

Нет, навсегда. Отныне Митчел уже, как правило, не участвует в опытах. Он пишет книгу. Свою первую книгу с подробным изложением хемиосмотической теории.

Собственно, книга была начата еще до Варшавы. Но в окончательном виде она была готова лишь к концу мая 1966 года. Не рассчитывая найти сколько-нибудь серьезное издательство, которое решилось бы на публикацию подробного описания только что публично отвергнутой гипотезы, Митчел напечатал книгу сам, на ротапринте.

Так появилась на свет брошюра в сером картонном переплете, на котором значилось: «Хемиосмотическое сопряжение в окислительном и фотосинтетическом фосфорилировании». Книга была разослана участникам варшавской дискуссии.

В конце того же 1966 года Митчела поддержала его Alma mater — Кембриджский университет, где согласи-

лесь опубликовать сокращенный вариант «Серой книги» в «Байолоджикал ревьюз».

В своей книге, ныне одной из самых широко цитируемых работ по биоэнергетике, Митчел рассмотрел механизмы реакций, которые могли бы сопровождаться переносом протонов и электронов через мембраны. Там же содержался ответ на конкретный вопрос, в какой степени среда инкубации с митохондриями должна закисляться при добавлении кислорода. Расчет дал курьезный результат: оказалось, что Митчел и Мойл не могли увидеть закисления среды в своих опытах 1965 года, если бы это закисление было обусловлено одним только разделением H^+ и OH^- в митохондриальной мембране.

Дело в том, что разделение протониев должно создавать разность электрических потенциалов (ее обозначают $\Delta\phi$) между двумя разграниченными мембраной отсеками. Если при дыхании ионы H^+ окажутся снаружи митохондрии, а ионы OH^- внутри, то внутренность митохондрии зарядится отрицательно, а внешний объем — положительно. Величина $\Delta\phi$ будет тем больше, чем больше протониев будет разделено мембраной.

Но $\Delta\phi$ не может возрастать беспредельно. Чем выше величина отрицательного заряда внутри митохондрий, тем труднее дыханию поддерживать процесс разделения ионов H^+ и OH^- . В какой-то момент разделение зарядов прекратится. Это случится тогда, когда выигрыш в энергии при реакциях дыхания окажется недостаточным, чтобы покрыть энергетический дефицит, возникающий при разделении протониев. Именно в этот момент дальнейшая зарядка электрической емкости мембраны станет невозможной.

Сопоставляя электрическую емкость мембраны и выделение энергии в процессе дыхания, Митчел заключил: мембрана зарядится так быстро, что кислотность снаружи митохондрий не успеет измениться сколько-нибудь заметным образом.

Не подрывает ли этот расчет хемиосмотическую гипотезу? Ведь мы говорили все время о нейтрализации кислоты и щелочи.

Оказывается, что нет.

Обратимся еще раз к схеме Митчеда. Согласно гипотезе синтез АТФ рождает положительные заряды (H^+) во внутреннем пространстве митохондрий, то есть

в отсеке, заряжающемся за счет дыхания отрицательно. Та же реакция синтеза АТФ приводит к уменьшению количества положительных зарядов (H^+) снаружи митохондрий, то есть там, где дыхание создает знак «плюс». Таким образом, синтез АТФ нейтрализует работу дыхательной системы, не только поставляя кислоту в защелачивающийся дыханием внутренний отсек митохондрии, но и образуя в этом отсеке положительные заряды. Тем самым дыхание может служить движущей силой для процесса фосфорилирования, даже не образуя сколько-нибудь заметной разности концентраций водородных ионов. Достаточно создания $\Delta\psi$.

Но что же в таком случае измеряли Митчел и Мойл в своих первых опытах? Откуда взялось закисление и что за магический эффект вещества, связывающего кальций?

Если закисление действительно было связано с работой дыхательных ферментов, то в условиях опыта электрическая емкость мембраны не ограничивала процесса разделения противоионов при дыхании.

Что, если в отрицательно заряженную внутреннюю полость митохондрии проникал какой-нибудь катион, например, кальций?

В своих опытах Митчел и Мойл не добавляли ионов кальция, но специально и не освобождались от них. Источником кальция могли быть реактивы, да и сами митохондрии. Но если все обстоит именно так, то давайте добавим кальций, и закисление должно возрасти... Митчел попросил свою сотрудницу поставить этот опыт. Закисление резко увеличилось!

Таков был ответ Чансу. Но еще не доказательство гипотезы; скорее свидетельство ее непотопляемости теми средствами, которые употребил в Варшаве знаменитый яхтсмен.

ПРОТОНОФОРЫ

«Серая книга» Митчела окончательно укрепила мое убеждение, что новая концепция достойна стать рабочей гипотезой биоэнергетики, заменив неудачную химическую схему. К тому времени мы уже были подготовлены к принятию хемиосмотической гипотезы всем предшествующим развитием своих работ: открытием эффекта двух путей окисления, а затем терморегуляторного разобщения в мышечных митохондриях и, на-

конец, отрицательным итогом опытов по проверке одного из вариантов химической схемы.

В частности, Митчел давал простой ответ на вопрос о том, как можно представить себе быстрое переключение дыхания на холостой путь, например, при охлаждении организма. Напомним, что, по Митчелу, дыхание образует избыток ионов водорода по одну сторону мембраны митохондрии, а при синтезе АТФ эти избыточные ионы водорода потребляются. Достаточно повысить проницаемость мембраны для протонов, как $\Delta\psi$ и разность рН исчезнут без всякого синтеза АТФ, дыхание пойдет без фосфорилирования, а вся энергия окислительных реакций превратится в тепло.

Впоследствии оказалось, что в разобщении на холоде участвуют свободные жирные кислоты, которые действительно повышают проницаемость мембран для водородных ионов. Но это уже следующая история.

В 1966 году сотрудник института биофизики Е. Либерман задался целью получить искусственные мембраны с такими же электрическими характеристиками, что и мембраны биологические. Он добавлял к фосфолипидам, из которых делали искусственные мембраны, различные вещества и смотрел, не снизится ли сопротивление до величин, характерных для внешней мембраны нейрона, популярного объекта электрофизиологических исследований. Одним из соединений, снижающих сопротивление, оказались жирные кислоты. Именно эти вещества, как мы думали, могут играть роль природных разобщителей.

В том же году А. Ленинджер, уже упоминавшийся нами известный биоэнергетик и автор самого знаменитого учебника по биохимии, поставил опыт по действию динитрофенола на искусственную мембрану. Как и у Е. Либермана, это была так называемая черная мембрана из фосфолипидов (черная — значит, такая тонкая, меньше длины волны видимого света, что уже не преломляет световых лучей). Мембрана закрывала небольшое отверстие в тефлоновой перегородке, разделяющей кювету на два отсека. В каждый из отсеков погружено по электроду, между ними вольтметр. В этой простой системе легко измерить сопротивление черной мембраны. Так вот оказалось, что добавка динитрофенола в оба отсека кюветы или даже в один из них заметно снижает сопротивление мембраны.

Сопоставив эти два наблюдения: одно, сделанное в Пущине, и другое — в Балтиморе, — с результатами Б. Чэпела на фосфолипидных мицеллах, я решил, что перед нами прекрасная модель для проверки одного из постулатов хемиосмотической теории, а именно концепции разобщителей как переносчиков водородных ионов.

Как-то поздно вечером, возвращаясь из МГУ с знаменитого биологического семинара И. Гельфанда вместе с Е. Либерманом, я предложил ему взять несколько разобщителей и проверить их действие на сопротивление черных мембран. Он немедленно согласился, заметив с воодушевлением, что это будет его первый опыт, где в равной степени окажется интересным как положительный, так и отрицательный результат.

Сначала Е. Либерман испытал два вещества, в сто раз отличавшиеся по разобщающей активности: слабый разобщитель динитрофенол и сильный с длинным названием тетрахлортрифторметилбензимидазол (ТТФБ). Добавление динитрофенола снижало сопротивление мембраны, что уже не было новостью после опытов Ленинджера. А как поведет себя мембрана после добавления ТТФБ? Первое впечатление — от капли этого вещества она просто лопнула. Но нет, мембрана-то есть, а вот ее сопротивление — оно катастрофически снизилось.

Измерение показало, что ТТФБ снижает сопротивление черной мембраны примерно в сто раз сильнее, чем динитрофенол.

Из 18 атомов, образующих молекулу ТТФБ, только один — атом водорода. Если ТТФБ — переносчик водородных ионов, то можно было бы думать, что замещение этого единственного водорода (кстати, легкоотщепляющегося) должно лишить вещество его способности разобщать дыхание и фосфорилирование и понижать сопротивление черной мембраны. Опыт подтвердил и это предположение.

Затем был взят еще десяток разобщителей, и всегда вещества, более активные в опытах с митохондриями, были более активны и на искусственных мембранах. Кроме того, удалось предсказать разобщающее действие веществ, ранее не подозревавшихся в этом качестве. Если выяснялось, что определенное химическое соедине-

ние создает протонную проводимость в черных мембранах, то можно было не сомневаться: оно разобщит дыхание и фосфорилирование в последующем опыте с митохондриями. Это правило не знало исключений.

Так был сделан вывод о справедливости предположения Митчела, касающегося природы феномена разобщения.

Вещества, повышающие протонную проводимость искусственных и биологических мембран, я окрестил «протонофорами».

КРАСНЫЕ ФЛАЖКИ НА КАРТЕ Работа по протонофорам вызвала ожесточенные споры, которые теперь, спустя 15 лет, кажутся уже не слишком интересными. Важно, что опыты оказались достаточно простыми, чтобы их воспроизвел любой биофизик, способный «повесить» черную мембрану на отверстие в тефлоновой перегородке. Вскоре термин «протонофор» замелькал на страницах научных статей, и изучение протонофоров стало новым направлением науки о мембранах.

Митчел воспринял приятную для себя весть по-своему. Он завел большую географическую карту мира и воткнул в Москву красный флажок.

Когда в 1975 году молодой сотрудник нашей лаборатории И. Козлов посетил Глинн Хауз, он обнаружил, что карта усеяна красивыми флажками: так Митчел отмечал места, откуда приходили вести о подтверждении хемиосмотической теории.

Но в 60-е годы, о которых сейчас у нас идет речь, до победы было еще далеко. Не утихали схоластические споры вокруг бесчисленных гипотез энергетического сопряжения, причем каждый из авторов тщился защитить свое детище от нападок, забывая о том, что в науке важно не кто первый, а кто прав. Если автор получал результат, противоречащий его предположениям, но подтверждающий гипотезу Митчела, то он принимался перекраивать свою концепцию вместо того, чтобы идти вперед, следуя за опытом, а не за мертвой схемой «бумажной биохимии».

Еще в 1964 году американцы С. Мур и Б. Прессман описали интереснейшее явление: повышение калиевой



проводимости мембраны митохондрий под действием валиномицина. Оказалось, что в присутствии этого антибиотика митохондрии начинают жадно поглощать калий в ответ на включение дыхания. Такой факт хорошо согласовывался с идеями Митчела. Ведь если дыхание создает разность потенциалов со знаком «минус» внутри митохондрий, то ион K^+ должен идти внутрь, к минусу, как только повысится калиевая проводимость митохондриальных мембран.

Однако сами авторы вместо этого естественного (теперь!) объяснения придумали сложнейшую схему, чтобы как-то увязать свои результаты с химической гипотезой. Они еще долго потом держались за свою точку зрения, хотя уже в 1967 году А. Лев в СССР и независимо П. Мюллер в США показали, что валиномицин создает специфическую калиевую проводимость в черных мембранах. В том же 1967 году Митчел и Мойл использовали открытия Мура, Прессмана, Льва и Мюллера, добавив валиномицин вместо кальция в своих опытах с митохондриями на рН-метре. Предсказание гипотезы состояло в том, что ионы калия в этих условиях будут способствовать закислению среды при добавке кислорода подобно тому, как это делают ионы кальция. Опыты полностью подтвердили такое предположение.

Ионы калия оказались удобнее, чем ионы кальция.

В отличие от кальция они не связываются с содержимым митохондрий и не повреждают их структуры, даже если накапливаются там в достаточно больших количествах. Именно это обстоятельство позволило Митчелу и Мойл определить величину разности потенциалов ($\Delta\psi$) на мембране дышащих митохондрий. Удалось измерить также и разность концентраций ионов H^+ между митохондриями и средой (сокращенно ΔpH).

Зная $\Delta\psi$ и ΔpH , Митчел подсчитал общую величину протондвижущей силы, то есть потенциальной энергии ионов H^+ (протонов), выделяющихся из митохондрий при дыхании и «стремящихся» вернуться назад, внутрь митохондрий, туда, где создалась нехватка положительных зарядов и более щелочная среда. Протондвижущая сила, или протонный потенциал, оказалась порядка четверти вольта. Эта величина соответствовала энергетическому дефициту, который необходимо было покрыть при синтезе АТФ из АДФ и фосфата, если принять, что на каждую синтезированную молекулу АТФ внутрь митохондрий возвращаются два иона H^+ .

Вряд ли такое количественное соответствие могло быть простой случайностью. Это наблюдение явилось еще одним доводом в пользу хемиосмотической гипотезы.

Однако оппоненты Митчела поставили под сомнение правомочность исходной предпосылки всей этой серии опытов. Где гарантия, говорили они, что валиномицин прошивает мембрану митохондрий насквозь, а не открывает ионам калия доступ к некой калиевой АТФазе, ферменту, который мог бы транспортировать калий внутрь митохондрий? К тому времени уже был описан во внешней мембране животных клеток фермент, переносящий калий за счет энергии гидролиза АТФ.

Митчелу нечего было возразить, но в душе он уже уверовал в свою правоту. Я помню его доклад в 1968 году на очередном европейском биохимическом съезде в Праге. Ученый вышел на трибуну в помятом дорожном пиджаке и принялся расхаживать, мягко ступая по сцене, победоносно поглядывая поверх стекол очков своими желтыми, немного кошачьими глазами. Время от времени он подходил к доске и, склонив набок крупную голову, рисовал по памяти графики опытов. Ему не смогла испортить настроение даже пропажа чемодана со всеми слайдами и парадным костюмом.

В кулуарах следом за Митчелом ходил пожилой, небольшого роста англичанин и поспешно записывал все его высказывания в дискуссиях, которые немедленно вспыхивали в компании биоэнергетиков, как только среди них появлялся вчерашний затворник из Бодмина. Меня заинтриговала эта фигура, слишком уж не соответствовавшая своей, по-видимому, секретарской роли.

— Кто это преследует Митчела? — спросил я у одного из своих английских коллег.

— Да это Гревил. Ему заказали обзор о гипотезе Митчела для одного из журналов, вот он и собирает материал!

А что же Чанс? Чанс, считавший своим долгом задать вопрос любому докладчику, чье выступление он удостоил своим присутствием, на сей раз хранил необычное молчание, как будто все происходящее его вовсе не касалось. Может быть, капитан спустил паруса, заметив неблагоприятное для себя направление ветра?

Тем временем Митчел пишет вторую «Серую книгу» и вновь издает ее на свой страх и риск. Потом ее публикуют полностью в международном журнале по биофизике в виде одной огромной статьи. Молодой американский биоэнергетик П. Хинкль, вскоре после этого приехавший к Митчелу поработать, говорил мне, что он никогда не видел такого счастливого человека, как Митчел, и такой счастливой семьи, как обитатели Глинн Хауза.

КОНФОРМАЦИОННАЯ ГИПОТЕЗА

Тем не менее борьба еще не окончена, и не только из-за калиевой АТФазы. Появляется на свет божий новая, так называемая конформационная гипотеза сопряжения. Она пытается избавиться от наиболее вопиющих недостатков химической схемы, не прибегая к протонному потенциалу. Автор конформационной концепции, американский биохимик П. Бойер, сразу же отказался от аналогий с брожением. Он не признавал мифических промежуточных продуктов вроде фосфорилированных ферментов дыхания. Предполагалось вместо этого, что перенос электронов дыхательным ферментом создает некую «напряженную конформацию», то есть сжимает молекулу фермента как пружину. Затем «конформационная энергия» передается АТФ-синтетазе, образующей

прочный комплекс с дыхательным ферментом. Релаксация (расслабление) напряженной АТФ-синтетазы ведет к синтезу АТФ.

Напряженная конформация, расслабление... Это все было взято из энергетики мышечного сокращения. Если химическая схема уподобляла систему дыхательного фосфорилирования брожению, то конформационная брала в основу биохимию белков мышц, которыми долгие годы занимался Бойер.

Две концепции — калиевой АТФазы и конформационного сопряжения — были противопоставлены хемиосмотической гипотезе на рубеже 60—70-х годов. Вокруг этих концепций дружно сплотились бывшие сторонники химической схемы, чтобы противостоять протондвижущей силе. Тогда их было еще большинство. Но с каждым годом увеличивалось число сторонников Митчела, множились красные флажки на карте в Глиин Хаузе.

**ЯГЕНДОРФ, ВИТТ,
БУЛЫЧЕВ И ДРУГИЕ**

Корнелльский университет
в Итаке (штат Нью-Йорк),

как мне объяснили по приезду в этот симпатичный городок на севере США, специализируется в подготовке ветеринаров и управляющих отелями. Не знаю уж, кому из них более интересен фотосинтез: ветеринарам, чьи подопечные нагуливают вес, поедая продукты фотосинтеза, или управляющим отелями, которым приходится следить, помимо прочего, за пальмами в гостиничных холлах.

Так или иначе в Корнелльском университете работал А. Ягендорф, специалист по фотофосфорилированию, то есть синтезу АТФ за счет энергии света в хлоропластах. До этого он провел некоторое время в лаборатории Митчела и, вернувшись в Итаку, решил проверить предсказательную силу новой гипотезы. Ягендорф поместил хлоропласты сначала в кислую, а потом в щелочную среду, измеряя при этом количество АТФ. Все манипуляции производились в темноте. Оказалось, что такая процедура ведет к образованию АТФ, как если бы мы на минутку выключили свет.

Система фотофосфорилирования работает без света. Удивительно?

А почему бы и нет, если, по Митчелу, свет нужен для синтеза АТФ только затем, чтобы разделить H^+ и

ОН — и образовать разность электрических потенциалов между внутренним пространством хлоропласта и окружающим раствором. Перенеся хлоропласты из кислой среды в щелочную, мы, так сказать, своими руками создаем необходимую разность концентраций водородных ионов, которая будет поддерживать какое-то время синтез АТФ без всякого света.

Городу Итаке красный флажок!

Университет в Западном Берлине. Лаборатория профессора Х. Витта. Исследуется электрохромный эффект Штарка: способность некоторых красителей менять свой спектр при помещении в сильное электрическое поле. Оказывается, пленки, приготовленные из смеси пигментов, содержащихся в хлоропластах, демонстрируют этот эффект. Интересно, конечно, но какое он имеет отношение к делу?

Самое прямое. Освещение хлоропластов вызывает спектральный сдвиг, подобный эффекту Штарка. Так, может быть, свет создает электрическое поле на хлоропластной мембране, где как раз и находятся исследованные Виттом пигменты? Тщательный анализ свидетельствует в пользу этого предположения.

Еще один флажок на карте...

А. Бульчев, В. Андрианов, Г. Курелла и Ф. Литвин, сотрудники биофака МГУ, ставят опыты на растениях с очень крупными хлоропластами. В один из хлоропластов удастся ввести микроэлектрод. Выясняется, что освещение вызывает образование разности потенциалов между хлоропластом и цитоплазмой клетки, куда введен другой электрод.

Рука Митчела тянется к красному флажку. Напрасно. Над Москвой красный флажок уже есть.

Но не думайте, что в Москве все шло так уж гладко. Когда я впервые рассказывал о хемиосмотической гипотезе на одной из всесоюзных конференций, то председательствующий быстро погасил мой пыл. Гипотеза, как было сказано, напомнила ему 20-е годы, когда все химические события в организме объясняли изменением баланса «кислых и щелочных едкостей». Шутка имела большой успех у аудитории.

На Международном ботаническом конгрессе, проходившем в нашей стране, физик Д. Чернавский выступил с заявлением о совершенной невозможности существования хемиосмотического механизма из сугубо теорети-

ческих соображений. Он говорил по-русски, а переводчика не было, так что один мой знакомый англичанин из всего выступления Чернавского понял только одно слово «Митчел», повторявшееся множество раз.

— Как все же у вас поддерживают Митчела! — сказал мне потом англичанин.

«ЧУДО-ИОНЫ»

После опытов с протонофорами мы взялись за проверку следующего постулата хемиосмотической гипотезы, а именно ее, так сказать «электрической части».

Митохондрия или хлоропласт — сложная штука, целое натуральное хозяйство внутри клетки. Может быть, когда-то это была самостоятельная клетка микроба, вступившего на путь симбиоза с более крупным хозяином. В митохондриях и хлоропластах есть множество ферментов, в том числе неизученных. Может статься, что среди них скрывается и калиевая АТФаза. Поэтому далеко не безопасно мерить разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$), используя природные ионы типа калия, как это сделал Митчел. Лучше бы взять ион искусственный, синтетический, непохожий ни на кого из своих природных собратьев. Но будет ли чужеродный ион проникать через митохондриальную мембрану?

К сожалению, скорее всего нет. Чтобы удерживать образуемую дыханием $\Delta\psi$, мембрана не должна пропускать ионы. Только очень узкий круг вполне определенных, «избранных» природных ионов имеет возможность пройти через мембрану митохондрий. Среди них ион кальция, который избирательно накапливается в митохондриях при участии особого переносчика, локализованного в митохондриальной мембране. Но ион кальция не годится по той же причине, что и калий (а вдруг в митохондриях есть кальциевая АТФаза, подобная, к примеру, той, которую обнаружили в некоторых других типах мембран).

Давайте подумаем, почему ионы не проходят через мембрану в отсутствие веществ-переносчиков или специальных ионных каналов?

Все природные мембраны сделаны из жиров и «жирных» белков, то есть полипептидных цепей с высоким содержанием гидрофобных аминокислот. Итак, мембрана жирная. Ионы же в водном растворе окружены связанными молекулами воды («водной шубой»), и их



сродство к жиру крайне низко. Именно поэтому мембрана — барьер для ионов.

Как же природа преодолевает эту трудность, столкнувшись с необходимостью повысить ионную проницаемость мембран? Обратимся к валиномицину, простейшему и наиболее изученному природному переносчику ионов (ионофору). Как показали академик Ю. Овчинников и его коллеги, валиномицин связывает ион калия своими гидрофильными карбонильными группами. При этом гидрофобные остатки аминокислот и оксикислот, образующих валиномицин, оказываются обращенными наружу, а калий занимает центральную полость молекулы антибиотика. Теперь калий окружен не водной шубой, а гидрофобными остатками, имеющими большое сродство к жиру. Так ион калия получает пропуск на вход в митохондрию.

Но такой пропуск нам не годится. Валиномицин очень разборчив в отношении иона-партнера и не связывает даже близкий по свойствам к калию ион натрия, Что уж говорить о не природных ионах!

А если взять какое-нибудь синтетическое соединение, в котором заряд экранирован гидрофобными заместителями? Не обойдется ли такой ион без пропуска?

Е. Либерман завел свой старенький автомобиль и отправился по московским химическим институтам в поисках «чудо-иона», который, он был твердо уверен, пы-

лится где-нибудь на полке у людей, не способных даже выговорить без запинки слово «фосфорилирование».

Вскоре Либерман вернулся к себе в подвал на Ленинском проспекте, 33, где в недрах одного из академических институтов у него была лабораторная комната. Портфель отяжелел от склянок с невиданными для биохимика веществами. Теперь уже его сотруднице Л. Цофиной пришлось встретиться с трудностями в произношении: «фенилдикарбаундекаборан...» Это анион, имеющий форму усеченного шара, сделанного из атомов бора. Кроме того, там есть фенильный остаток и отрицательный заряд, «размазанный» по всей этой ни на что природное не похожей молекуле, названной для краткости ФКБ^- . А вот еще один анион: тетрафенилбор (ТФБ^-). Он устроен попроще: четыре фенильных остатка, а в центре бор. Его «электрический антипод» — катион тетрафенилфосфоний (ТФФ^+). Он построен так же, как ТФБ^- , но вместо бора — фосфор, и в результате заряд «плюс».

— Почему вы взяли такое сложное для синтеза вещество, как ФКБ^- ? — спросил меня как-то сотрудник американской фирмы по производству реактивов, только что наладивший за океаном выпуск ФКБ^- на продажу.

Я не стал его огорчать историей случайной находки ФКБ^- и сказал, что это самый лучший среди проникающих синтетических анионов.

Либерман, Цофина и их сотрудники обнаружили, что искусственные мембраны практически не создают препятствия для движения ФКБ^- . Несколько меньшей, но все же достаточно высокой проникающей способностью обладали также и кое-какие другие из реквизируемых Либерманом ионов.

Но как поведут себя ионы-безбилетники в митохондриях? На этот вопрос вскоре смог дать ответ наш сотрудник А. Ясайтис. Оказалось, что они успешно заменяют калий и валиномицин в опытах «à la Митчел и Мойл...».

Вскоре Либерман придумал простой метод измерения «чудо-ионов», и мы получили возможность непрерывно следить за концентрацией этих ионов в растворе.

Проникающие синтетические ионы вели себя в полном соответствии с предсказанием хемиосмотической гипотезы. При включении дыхания катионы послушно направлялись внутрь митохондрий, к минусу, а анионы на-

ружу, к плюсу. Мы называли это явление электрофорезом проникающих ионов (по аналогии с известным методом разделения заряженных веществ в электрическом поле). Но действительно ли дело в электрофорезе?

Что же, давайте еще раз проверим предсказательную силу «электрической» концепции.

Если обработать митохондрии ультразвуком, они распадутся на мелкие замкнутые пузырьки, окруженные как бы вывернутой наизнанку мембраной: в пузырьках грибовидные выросты АТФ-синтетазы смотрят наружу, в то время как в митохондриях они обращены внутрь. Изменение ориентации мембраны должно повлечь за собой и изменение направления электрического поля.

Опыт — и вновь удача! При дыхании или гидролизе АТФ наблюдалось поглощение анионов (а не катионов, как в опытах с митохондриями).

И в митохондриях, и в вывернутых пузырьках эффекты дыхания и АТФ полностью предотвращались разобщителями-протонофорами.

Когда я доложил результаты наших опытов на съезде европейских биохимиков в Мадриде в 1969 году, это вызвало яростную атаку со стороны Чанса. Он сразу понял, что работа с синтетическими ионами позволяет заполнить недостающее звено в цепи доказательства «электрической части» Митчеловой схемы. Чанс четырежды выступал по поводу моего семиминутного сообщения, и мне пришлось мобилизовать все резервы, чтобы сдерживать грозного противника.

Вернувшись из Испании, Чанс тотчас воспроизвел опыты с синтетическими ионами. Для уточнения деталей был послан в Москву его «полномочный представитель» доктор А. Гозалбес. Осенью того же 1969 года в одном из биохимических журналов появилось сообщение Б. Чанса и соавтора, где эффект проникающих ионов был воспроизведен и истолкован в рамках схемы Митчела. Казалось, теперь уж наш капитан действительно спустил паруса.

Впоследствии проникающие синтетические ионы были неоднократно использованы в других лабораториях. Этим методом было выявлено образование разности электрических потенциалов на митохондриях из разных тканей, на бактериях и хлоропластах, то есть на всех основных типах мембранных структур, в которых образуется АТФ. Чтобы не перечислять каждый раз непри-

вычные названия синтетических ионов, Д. Грин предложил всех их называть «Скулачев-ионами», обозначая катионы Sk^+ , а анионы Sk^- . Это, конечно, глубоко несправедливо, ведь за «чудо-ионами» ездил на машине не я, а Либерман.

ИСТОРИЯ ПОВТОРЯЕТСЯ

Симпозиум по биоэнергетике 8-го Международного биохимического конгресса был вынесен в Люцерн. Других симпозиумов в сентябрьские дни 1970 года в Люцерне не проводилось, и потому любой оказавшийся там биохимик наверняка имел представление о митохондриях, П. Митчеле и Б. Чансе. Здесь можно было спокойно обсудить «классическую проблему» биоэнергетики, не опасаясь, что ваш собеседник на полуфразе вдруг сорвется с места и побежит на заседание слушать тех, кто синтезирует гены.

Собрание в Люцерне производило немного странное впечатление. Всюду царил та атмосфера напряженного ожидания, что возникает в компании, когда все уже в сборе, кроме виновника торжества. В торопливой и сбивчивой манере прочел свой доклад П. Митчел. Против него вновь выступили Э. Слейтер, Л. Эрнстер, Ф. Аццоне. Англичанин отвечал необычно резко, раздраженно. Его противники запальчиво возражали. Нельзя было не заметить, что в их докладах вновь появились варианты старой химической схемы, с которыми они вряд ли решились бы выйти на трибуну год назад. И снова Чанс яростно отрицал право хемиосмотической концепции на существование, будто не он, а его двойник печатно признал в прошлом году Митчелово кредо.

— Вы видели статью Хантера? — В обращенном ко мне вопросе Митчела с трудом скрывается тревога.

В кулуарах Люцернского симпозиума о Хантере говорили все, хотя сам он в Швейцарию не приехал. Всеобщее возбуждение вызвала серия из четырех статей за подписью А. Пэйнтера и Ф. Хантера, появившаяся в одном из последних номеров «Сообщений по биохимии и биофизике». Сам факт, что этот международный журнал, предназначенный для срочных кратких публикаций, отступил от своих правил и принял целую серию статей одних и тех же авторов, свидетельствовал о сенсационном характере представленных материалов. Знакомство с работой подтверждало это впечатление.

В статьях Пэйнтер и Хантера из университета в Сент-Луисе сообщалось о синтезе АТФ в водном растворе, содержащем всего один небольшой по размеру белок — цитохром *c*. Процесс прекращался разобщителями, хотя никаких мембран в системе не было и не могло быть.

Этот результат оказался в вопиющем противоречии с концепцией Митчела. Его подтверждение означало бы конец хемиосмотической гипотезы: ведь у Пэйнтер и Хантера не было двух отсеков, разделенных преградой, и потому не могло происходить никакого разделения кислоты и щелочи, положительных и отрицательных зарядов!

Эпиграфом к одной из глав своей книги «Биоэнергетические механизмы» Э. Ракер взял слова Т. Гексли: «Трагедия науки: один гнусный маленький факт убивает прекрасную гипотезу». Но как человек, умудренный опытом современной биохимии с ее хитросплетениями путей обмена веществ и длинными рядами логических построений, Ракер, мудрый Ракер так комментировал великого биолога — «наблюдателя природы» прошлого века: «Давайте, однако, принимать эти гнусные факты такими, как они есть: в лучшем случае это косвенные данные, а подчас и артефакты. Прежде чем выносить заключение об убийстве, удостоверимся, что перед нами действительно труп. Хорошая гипотеза, право же, стоит нескольких гнусных маленьких фактов и нескольких сот негативных экспериментов».

Вернувшись в Москву, я прежде всего решил повторить опыты Пэйнтер и Хантера, благо их система была до чрезвычайности простой. Первые попытки — и неудача. Может быть, не те реактивы? Возьмем другие и проведем реакцию еще раз...

Эта проверка стоила мне нескольких седых волос, а нашей аспирантке Т. Гудзь пары месяцев короткого аспирантского срока. Стремясь повторить чужой опыт, я не надеялся на лавры победителя (они все равно достались бы Хантеру в случае подтверждения его работы). Отрицательный результат также не продвигал нас вперед. Он мог лишь приглушить голос сомнения (а вдруг тогда, пять лет назад, в Варшаве, я ступил на ложный путь и повел своих товарищей «дорогой никуда», которых так много в науке?). Так кто же прав: Ф. Хантер там, в Сент-Луисе, или мы здесь, в Москве?

Еще до опытов по проверке Пэйнтер и Хантера я

написал в отчете о Люцернском симпозиуме для «Успехов современной биологии»: «Известный оптимизм в отношении результатов предполагаемой проверки внушает огромный опыт Хантера в области окислительного фосфорилирования... По широте фронта исследований и их продуктивности группа в Сент-Луисе всегда уступала ведущим американским центрам, таким, как лаборатории Ленинджера, Чанса, Грина, Ракера. Однако работы Хантера, не слишком яркие по своему значению, неизменно отличались высоким запасом прочности: за двадцатилетний срок ни одна из них не была опровергнута или поставлена под сомнение. Вот почему публикация Хантера была воспринята без того скепсиса, с которым встречали в последнее время любые работы, претендующие на решение проблемы окислительного фосфорилирования».

...Спустя несколько месяцев до нас дошел слух, что все данные сенсационных статей двух американцев фальсифицированы. Вскоре стали известны подробности этого нового скандала в биоэнергетике. Пэйнтер, как за шесть лет до этого Уэбстер у Грина, использовала разброс данных по включению меченого фосфата в АТФ, чтобы убедить Хантера, руководителя ее аспирантской работы, в том, что в растворе происходит синтез АТФ. Вот вам и аккуратист Хантер! Что же, и на старуху бывает проруха!

КАРФАГЕН ДОЛЖЕН БЫТЬ РАЗРУШЕН!

Уже после первого нашего совместного опыта с разобчителями в 1966 году Е. Либерман заявил, что хемиосмотическая гипотеза доказана. Мне полученный результат показался условием необходимым, но недостаточным. Чтобы решить спор, мы затеяли работу с синтетическими ионами. По ее завершении у меня исчезли последние сомнения. Действительно было установлено, что и дыхание и гидролиз АТФ могут образовывать разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) и разность концентраций водородных ионов (ΔpH), то есть протонный потенциал:

дыхание $\rightarrow$ протонный потенциал $\leftarrow$ АТФ.

Приняв, что второй процесс обратим, мы получим:

дыхание $\rightarrow$ протонный потенциал $\rightarrow$ АТФ.

Другими словами, дыхание и фосфорилирование связаны через протонный потенциал.



Синтез АТФ за счет искусственно созданной $\Delta\mu$ был обнаружен еще А. Ягендорфом. О том, что $\Delta\psi$ также может служить источником энергии для фосфорилирования, говорили опыты Б. Прессмана, поставленные в 1967 году. Митохондрии выдерживали с ионами калия и затем помещали в среду без калия. Для повышения калиевой проводимости мембран добавляли валиномицин. Выход ионов калия из митохондрий в бескалиевую среду создавал нехватку положительных зарядов внутри митохондрий. Если бескалиевая среда содержала АДФ и фосфат, то синтезировался АТФ.

Сопоставив эти данные с результатами опытов, описанных выше, я решил, что настало время объявить о доказательстве Митчелова принципа сопряжения.

Доклад на Европейском биохимическом съезде в Варне в 1971 году показался мне подходящим случаем, чтобы выступить с этим заявлением.

Бог мой, что тут началось! После более чем оживленной дискуссии, выплеснувшейся в кулуары конгресса, один из оппонентов заметил, что даже Митчел, отсутствовавший в Варне, вряд ли счел бы мое выступление своевременным. Действительно, спустя некоторое время я получил конверт со штампом «Бодмин» и посланием Митчела, где он писал, что считает меня слишком большим энтузиастом хемиосмотической теории.

Мы вновь увиделись с ним через год, на следующем съезде европейских биохимиков. Митчел председательствовал на моей лекции, и я не без волнения вновь показал уже несколько затертый заключительный слайд своего варненского доклада, сопроводив его латынью: «Ceterum censeo Carthaginem delendam esse!» («При всем том я думаю, что Карфаген должен быть разрушен!»)

Председатель уже не возражал. Видно, латынь пришлась по душе выпускнику колледжа Иисуса в Кембридже! Желтые глаза Митчела лучились, он, кажется, даже приоткрыл от удовольствия рот, показав язык нашим оппонентам в зале.

— Вы будете держать флаг, — сказал мне Митчел, уезжая в Англию накануне постсимпозиума по биоэнергетике, где предполагалось нелицеприятное обсуждение конкурирующих теорий. Он вообще (а после Варшавы в особенности) не любил открытых дискуссий.

— Мой компьютер работает медленно, — говорил он, постукивая пальцем по своему высокому лбу.

Бой на постсимпозиуме пришлось принять мне.

Что же возразили наши противники?

Их главный аргумент состоял в том, что митохондрия слишком сложна, чтобы имеющийся в наших руках материал был достаточен для вывода о сопрягающей роли протонного потенциала.

— Почему вы думаете, — спрашивали меня, — что протонный потенциал стоит между дыханием и АТФ, а не где-нибудь в стороне? Например:

дыхание → ? → АТФ → протонный потенциал
или

протонный потенциал → дыхание → ? → АТФ?

Напрасно я говорил о том, что хемиосмотической гипотезой предсказаны явления, мысль о существовании которых не могла даже прийти в голову, если придерживаться любой другой схемы. Оппоненты были неумолимы. Практически все маститые биоэнергетики, присутствовавшие в зале, не разделяли моей точки зрения.

После истории с Уэбстером и Грином, Пэйнтер и Хантером они уже ничему не верили на слово. Каждый хотел на собственном опыте убедиться в правоте логического построения и отсутствии альтернативных объяснений.

Итак, к 1972 году дискуссия между сторонниками хе-

миосмотической теории и ее противниками переместилась в новую плоскость. Если раньше ставилось под сомнение само существование протонного потенциала, то теперь речь шла лишь о том, как образуется этот потенциал и какова его роль в энергетике клетки.

Очередной вопрос, на который предстояло ответить, состоял в следующем: действительно ли есть два пути образования протонного потенциала: один, использующий энергию дыхания, и другой, использующий энергию АТФ, или существует лишь один такой путь (либо дыхание, либо АТФ).

Чтобы решить эту проблему, необходимо было разделить ферменты, участвующие в дыхании и гидролизе АТФ, и показать, что каждый из них, взятый в отдельности, может образовать протонный потенциал. Следовало сперва разобрать мембрану митохондрий на части — разделить белки и липиды, потом очистить какой-либо один тип белков, например дыхательный фермент, и после этого посмотреть, может ли этот фермент образовать протонный потенциал.

— Позвольте, — возразите вы, — но ведь протонный потенциал — это трансмембранная потенциальная энергия протонов, а мембрану-то мы уже разрушили!

— Ну и что? Сначала разрушили, а теперь сделаем, да такую, что в ней будет только один тип белков — дыхательный фермент!

— А если природная мембрана, однажды разрушенная, вообще не может быть воссоздана? Если мембрана происходит от мембраны, как клетка от клетки?

— Волков бояться — в лес не ходить.

Э. Ракер волков не боялся (хотя бы потому, что, как говорят, в штате Нью-Йорк они давно вывелись). И вот в Корнелльском университете началась работа по сборке мембран. Многие месяцы подряд японский стажер Я. Кагава испытывал разные белки, фосфолипиды и способы разрушения мембран, пока наконец один из вариантов опыта не принес надежду на успех. Взяв фосфолипиды из сои и фермент АТФазу из митохондрий бычьего сердца, Кагава растворил их в воде с помощью одной из желчных кислот. Затем он осторожно удалил желчную кислоту и обнаружил, что в растворе получились пузырьки, способные расщеплять АТФ. Скорость

распада АТФ повышалась динитрофенолом, что могло бы свидетельствовать о генерации протонного потенциала на мембранах пузырьков.

Незадолго до опытов Кагавы в лабораторию Ракера возвратился из годичной стажировки П. Хинкль, посланный Ракером к Митчелу на выручку. Хинкль не только освоил новую теорию, но и провел в Глинн Хаузе ряд изящных опытов с митохондриями, исследуя один из дыхательных ферментов, цитохромоксидазу. Вернувшись в Итаку, Хинкль заразил Ракера своим митчельянством так, что тот стал первым из признанных корифеев биоэнергетики, кто поддержал Митчела.

Если АТФаза и АТФ-синтетаза, рассуждали Ракер и Хинкль, — это один и тот же фермент, а роль дыхания состоит только в том, чтобы образовать протонный потенциал, необходимый для фосфорилирования, тогда стоит лишь включить в АТФазные пузырьки Кагавы еще и дыхательный фермент, как они, эти пузырьки, начнут образовывать АТФ за счет дыхания.

Ракер засучил рукава белоснежного халата и взялся встраивать цитохромоксидазу в АТФазные пузырьки Кагавы.

Вскоре в американском биохимическом журнале появилось сенсационное сообщение, подписанное Э. Ракером и его лаборанткой А. Кандраш, о самосборке системы дыхательного фосфорилирования. Пузырьки, содержащие АТФазу и цитохромоксидазу, образовывали АТФ при окислении аскорбиновой кислоты. Синтез АТФ полностью прекращался добавлением разобщителей-протонофоров.

Услышав об открытии Ракера, я попросил А. Ясаятиса наладить получение таких же пузырьков здесь, в Москве. Сказано — сделано! И вот уже передо мной три пробирки: в одной пузырьки с АТФазой, в другой — с цитохромоксидазой, а в третьей — с двумя этими ферментами вместе. Попробовали проникающие ионы. Как и следовало ожидать, в белково-липидных пузырьках происходил электрофорез синтетических ионов.

Источниками энергии для транспорта наших ионов могли служить: в АТФазных пузырьках — гидролиз АТФ, в цитохромоксидазных — дыхание, а в смешанных — оба эти процесса. Восстановителем цитохромоксидазы служил водорастворимый белок цитохром *c*.

Удалось приготовить цитохромоксидазные пузырьки

двух типов: одни с цитохромом *c* внутри и другие с цитохромом *c* снаружи. В первом случае внутренность пузырьков должна заряжаться положительно, во втором — отрицательно. Чтобы проверить, правильно ли это предположение, были взяты два очень близких по структуре, но разных по заряду иона — ТФБ⁻ и ТФФ⁺. Оказалось, что при дыхании пузырьки с цитохромом *c* внутри поглощают ТФБ⁻, а пузырьки с цитохромом *c* снаружи поглощают ТФФ⁺.

Так сбылось еще одно предсказание гипотезы, а в целом был сделан новый шаг вперед. Теперь я уже мог ответить моим критикам: протонный потенциал есть общий продукт двух разных ферментативных систем — дыхательной и АТФазной.

Вообще мне чрезвычайно понравились эти самые фосфолипидные пузырьки, инкрустированные очищенным белком, — простейшая модель, где еще сохранялась интересовавшая нас функция, то есть преобразование химической энергии в электрическую. Я назвал такие пузырьки протеолипосомами, и это имя, кажется, прижилось.

Занятно следить за новыми словами, которые ты придумал, чтобы выпустить в большой мир. Вводить новые слова приходится не ради забавы, а по необходимости, чтобы как-то назвать невиданный раньше предмет, явление или свойство.

Бывает, что слова отражают характер их создателей, которые иногда, не задумываясь о последствиях, пускают в обиход научных статей поспешные творения лабораторного жаргона. Мне кажется, что термин «дигидрокодегидрогеназа» придумал человек либо очень скучный, либо не очень внимательный к своей речи. Но он был первооткрывателем, и термин этот, хоть и неблагозвучный, продержался в биохимической литературе десятки лет, пока не была расшифрована химическая структура так неудачно названного вещества. Потом это слово бесследно исчезло из языка, уступив место буквенному сокращению его структурной формулы.

Иной раз язык активно противится новому слову, выталкивает его, не принимая неудачника в свое лоно. Академик М. Колосов рассказывал мне, что термин «алкоголиз», то есть лизис (расщепление) какого-либо вещества алкоголем, употребленный в посмертном издании трудов академика М. Шемякина, корректоры упор-



но исправляли на «алкоголизм», и, хотя на всех стадиях корректуры злосчастное «м» безжалостно вымарывалось, в самый последний момент в типографии все же восстановили эту букву, уверенные, что она случайно потерялась на предыдущей стадии полиграфического процесса.

Особенно трудны, а иногда и просто опасны неологизмы, связанные с переводом вновь возникшего термина на иностранный язык. Так, в своем труде о Марсе Дж. Скипарелли написал по-итальянски *capali*, имея в виду борозды. Затем это слово было механически перенесено в английский и другие языки, что определенно способствовало созданию бума вокруг несуществующих марсианских каналов.

Решив опубликовать по-английски работу о протеолипосомах, я долго не мог придумать, как назвать операцию включения белка в липидный слой мембраны. В конце концов остановился на глаголе *inlay* («инкрустировать»). Когда же потребовалось соответствующее причастие («инкрустированный»), я написал «*inlayed*», забыв, что *inlay* — глагол неправильный, как и *lay*, от которого он происходит, и его причастная форма должна писаться «*inlaid*».

Свою ошибку я обнаружил лишь после того, как статья вышла в свет. Старейшее в мире издательство «Эл-

зевир», что в Голландии, не заметило моей оплошности, и не существующее в английском языке слово «inlayed» смотрело теперь на меня с набранного крупным шрифтом заглавия статьи.

Я долго сокрушался по поводу своей безграмотности. Представьте же себе мое изумление, когда спустя несколько лет после этого случая я вдруг обнаружил свое «inlayed» в статье известного мексиканского биохимика. Повторяя наши опыты и производя ту же операцию включения белка в мембрану, он употребил причастие «inlayed». Потом я встретил такое же написание у своего коллеги из Индии, затем у немца; а недавно в статье группы американских авторов. Видимо, «inlayed» стало термином.

БЕЛКИ—ГЕНЕРАТОРЫ ТОКА

**ДРАЧЕВ
И ВАКТЕРИОРОДОПСИН**

Л. Драчев никогда специально не изучал ни биологии, ни химии. Даже в школе. В связи с военным временем и нехваткой учителей вместо этих предметов преподавали математику.

Окончив физфак МГУ, он занялся ионосферой, а потом лазерами. Нас познакомил Либерман. Он же санировал Драчева включиться в биоэлектрическую эпопею. С легкой руки ректора МГУ Р. Хохлова Драчев стал сотрудником нашей лаборатории.

Услышав истории о проникающих ионах, протеолипосомах и прочих премудростях биоэнергетики, Драчев флегматично заметил, что электричество, если его действительно генерируют мембранные белки, хорошо бы мерить вольтметром и амперметром.

Мы сами знали, что хорошо бы, и потому не сочли мнение Драчева за снобизм чужака-физика. Проникающие ионы, электрохромизм в опытах Витта или открытые позже флуоресцентные красители, реагирующие на $\Delta\psi$, — это все же косвенные методы. А в столь сложной системе, как биологическая, одно прямое измерение стоит сотен косвенных. Например, такое чуждое для живой клетки вещество, как ТФБ⁻, совершенно неожиданно оказалось восстановителем для одного из ферментов в хлоропластах. А ведь ТФБ⁻ считали биологически инертным соединением! Так что мы сразу согласились с Драчевым.

Однако как прямо измерить производство электричества белками? Вводить микроэлектрод в митохондрию? Но она слишком сложна.

Мое воображение уже было отравлено гениальной простотой протеолипосом. Микроэлектрод в протеолипосому? Так ведь она всего 0,1 микрона в диаметре!

Нет, это не путь. А если включить белок — генератор тока в черную искусственную мембрану? Тогда бы мы измерили разность потенциалов и ток обычными электродами, помещенными в растворы по обе стороны от перегородки, отверстие в которой закрыто мембраной. Но как включить белок в черную мембрану?

Белки, генераторы электричества, как и другие мембранные белки, в воде нерастворимы. Попробуем добавить их к раствору фосфолипидов в декане, который применяют обычно для образования черной мембраны. А какой взять белок?

Конечно, тот, что может использовать энергию света! Добавлять растворы окисляемых веществ или АТФ в таком опыте неудобно: черная мембрана вообще непрочна. Это, по существу, оболочка мыльного пузыря. Да еще белковые включения, которые, вероятно, прочности мембране не прибавят! Капля любого раствора может ее разрушить. Свет, безусловно, удобнее.

Итак, должен быть какой-то из белков, участвующий в усвоении энергии света, то есть в фотосинтезе.

Как раз в это время У. Стокениус и Д. Остерхельт в США описали новый тип светочувствительных белков бактериородопсин. Как выяснилось, у солелюбивых бактерий есть фиолетового цвета белок, содержащий, подобно зрительному пурпуру глаза — родопсину, — производное витамина А — ретиналь. Было получено косвенное указание на то, что бактериородопсин может переносить через мембрану водородные ионы за счет энергии света, заменяя содержащие хлорофилл белки обычных организмов-фотосинтетиков.

В конце 1973 года академик Ю. Овчинников организовал проект «Родопсин» для сравнительного исследования животного и бактериального пигментов. Мы занялись изучением бактериородопсина, используя препарат, полученный в Институте биофизики Л. Чекулаевой, тогда сотрудницей лаборатории Л. Каюшина. Были приготовлены протеолипосомы с бактериородопсином в качестве белка. Затем методом проникающих ионов была доказана способность бактериодопсина превращать свет в разность электрических потенциалов.

Я хорошо помню эти опыты. Особенно удачно они шли по воскресеньям, когда в опустевшей лаборатории никто не ходил мимо прибора и тончайшая фосфолипидная мембрана, измеряющая концентрацию ФКБ^- , стояла, не лопааясь, в течение нескольких часов кряду. Я включал и выключал свет, наслаждаясь стабильностью и воспроизводимостью обнаруженного явления. Бактериородопсин работал как часы: протеолипосомы безотказно поглощали анионы (ФКБ^-) в ответ на свет и отдавали их в среду в ответ на «тьму». Приходя по-

сле опыта домой, я развешивал ленты самописца по стенам, чтобы полюбоваться ими на сон грядущий.

Бактериородопсин оказался действительно на редкость стабильным генератором протонного потенциала. Эту его способность не могло убить нагревание до 100 градусов, помещение в 0,1 N кислоту и, как мы выяснили вместе с сотрудниками Овчинникова, даже расщепление белка в трех местах протеолитическим ферментом. Поэтому неудивительно, что было решено попытаться счастья с прямым измерением разности потенциалов, используя именно бактериородопсин. План был прост: добавить бактериородопсин к смеси для приготовления черной мембраны и посмотреть, не приведет ли освещение такой мембраны к генерации тока.

Никогда не прощу своим товарищам, что они не позвали меня к прибору, когда впервые осветили мембрану с бактериородопсином. Осторожный Драчев, улыбаясь и пощипывая бородку, сообщил мне о генерации фототока лишь на следующий день.

Так в прямом опыте была доказана способность индивидуального белка превращать энергию света в электричество.

СУП ИЗ ТОПОРА

Справедливости ради надо сказать, что разность потенциалов, генерируемая на свету, в первом опыте Л. Драчева не превышала 20 милливольт. Это примерно в 12 раз меньше величины, необходимой для энергообеспечения процесса фосфорилирования. Причиной, вызвавшей резкое занижение фотопотенциала, был двоякий характер ориентации бактериородопсина в черной мембране: часть молекул белка генерировала ток одного направления, а другая часть — противоположного. Это и неудивительно, ведь черная мембрана симметрична, и в идеале фотопотенциал не должен был образовываться вовсе. Если все же его удалось обнаружить, то лишь из-за небольшого случайного превышения количества белка, встроившегося, скажем, с левой стороны мембраны, над белком с правой ее стороны.

Как же упорядочить ориентацию бактериородопсина в искусственной мембране? Первоначально мы не знали даже, с какого конца подступиться к проблеме. Но нам повезло: решение вскоре было найдено совершенно случайно.

Как-то наш молодой сотрудник А. Семенов ставил опыт с протеолипосомами, поглощавшими на свету про-никающие анионы ФКБ^- . Варьируя состав раствора с протеолипосомами, он добавил в смесь сульфат магния. Никаких изменений добавка не вызвала, и Семенов совсем было собрался прекратить эксперимент, но в этот момент в лабораторию зашел кто-то из его знакомых.

За приятной беседой сотрудник забыл о своем намерении сменить не оправдавшую его ожиданий пробу и вновь включил свет. К своему удивлению, он обнаружил, что теперь свет вызывает заметно больший эффект, чем десять минут назад. Семенов включил свет еще раз и, убедившись, что явление не исчезло, отправился на поиски шефа, чтобы похвалиться своим маленьким открытием. На эти поиски ушло еще четверть часа.

— Смотрите, как вырос фотоэффект, — сказал он и вновь включил свет.

Перо самописца резко метнулось к краю измерительной шкалы и, пока мы обалдело следили за поистине циклопическим фотоэффектом, застряло в краевой перфорации ленты и начало рвать бумагу в напрасных попытках продвинуться дальше. Я быстро освободил перо из плена, а Семенов переключил шкалу вольтметра с 10 на 100 милливольт.

На сей раз фотоэффект удалось записать. Это был огромный потенциал, который рос на глазах. Так продолжалось еще около часа, после чего лопнула черная мембрана, использовавшаяся в этом опыте для измерения концентрации анионов ФКБ^- . Мы поставили новую мембрану и на всякий случай еще раз заглубили шкалу, полагая, что за время установки мембраны эффект еще более возрос.

Включили свет — перо вздрогнуло и отползло, словно нехотя, на два миллиметра в сторону. Повторное освещение дало тот же жалкий результат. Немедленно у прибора был созван консилиум лучших умов лаборатории, находившихся в пределах досягаемости. Пока судили да рядили, как объяснить только что наблюдавшийся и внезапно утраченный гигантский фотоэффект, прошло какое-то время, и Семенов для очистки совести еще разок осветил ячейку с протеолипосомами.

— Смотрите! Он вернулся! — услышали мы у себя за спиной торжествующий возглас.

И правда, эффект-богатырь возник вновь. Налицо было какое-то медленно развивающееся явление, исчезающее всякий раз, когда мы заменяли одну измерительную мембрану другой. Стало быть, измерительная мембрана, а вовсе не протеолипосомы, подвергалась действию сульфата магния.

Чтобы убедиться в правоте этой, казалось бы, очевидной посылки (если не протеолипосомы, значит, измерительная мембрана, ведь больше ничего в нашей системе просто нет), мы добавили сульфат магния в омывающий искусственную мембрану раствор, не содержащий протеолипосом. Спустя час в тот же раствор внесли протеолипосомы и измерили фотоэффект. Если дело в мембране, то свет должен бы вызвать образование большой разности потенциалов.

Не тут-то было! Перед нами вновь был эффект-пигмей! Однако со временем он увеличился и через час-полтора достиг огромных размеров.

Что же это получается? В системе всего два компонента: протеолипосомы и искусственная мембрана, и оба они, отдельно взятые, устойчивы к действию сульфата магния. Тем не менее сульфат магния действует, да так мощно! А может быть, секрет его магического влияния надо искать в каком-то эффекте, требующем одновременного присутствия и протеолипосом и мембраны?

В дальнейшем оказалось, что сульфат магния можно заменить хлористым магнием, но не хлористым калием. Это указывало, что действующее начало — ион магния.

Известно, что двухвалентные катионы магния и кальция нейтрализуют отрицательные заряды на поверхности фосфолипидных мембран, образуя прочные комплексы с анионами фосфатных групп фосфолипида. Именно эти отрицательные заряды предотвращают слипание фосфолипидных пузырьков друг с другом. Быть может, в нашей системе магний вызывал слипание протеолипосом друг с другом?

Но для чего в таком случае искусственная мембрана? Нет, это не объяснение.

А вдруг протеолипосомы склеиваются с искусственной мембраной, ведь она тоже состоит из фосфолипидов? Тогда возникающий со временем высокий фотопотенциал мог бы в принципе иметь ту же природу, что в опытах Л. Драчева: бактериородопсин протеолипосом,

приклеившихся к искусственной мембране, генерирует на свету разность потенциалов, которая регистрируется нашим вольтметром. В результате мембрана, предназначенная для регистрации количества анионов ФКБ-, измеряет вовсе не этот параметр, а непосредственно работу бактериородопсина как электрического генератора.

Проверить такое предположение не составило большого труда. Мы просто повторили опыт, но без анионов ФКБ-. Это был, так сказать, суп из топора: система для измерения проникающих анионов содержала все компоненты, необходимые, чтобы произвести такое измерение, за исключением самих анионов. И что же: со временем развился мощный фотоэффект. Его величина оказалась гораздо большей, чем в первых опытах Л. Драчева, когда мембрану образовывали из смеси бактериородопсина и фосфолипидов.

Последующее разбирательство показало, что в системе «протеолипосомы — искусственная мембрана» бактериородопсин всегда ориентирован таким образом, что он транспортирует протоны из омывающего раствора внутрь приклеенных к мембране протеолипосом. Так мы получили систему, где из двух противоположно включенных биологических фотобатарей осталась одна.

Используя новый метод, нам удалось добиться фотопотенциалов до 0,3 вольта, что превышает величину, необходимую для энергообеспечения синтеза АТФ.

Затем последовали годы работы по проверке других белков — генераторов протонного потенциала, совершенствованию метода встраивания белков в мембрану, стабилизации самой мембраны. Выдающиеся качества Л. Драчева как виртуозного физика-экспериментатора позволили разработать универсальный метод, позволяющий измерять перенос протонов внутри мембраны за время, равное одной десятиллионной доле секунды.

Сегодня опыт Л. Драчева воспроизведен в десятках других лабораторий у нас в стране и за рубежом. Электрическая часть хемиосмотической гипотезы получила свое окончательное подтверждение.

ПОСЛЕДНЯЯ КАПЛЯ

О своей догадке, что бактериородопсин может быть генератором протонного потенциала, мне рассказал У. Стокениус в феврале 1973 года в Нью-Йорке. Он разложил свои графики на столе, креслах и необъятной

двухспальной кровати в номере отеля и спросил, что я, как митчельянец, обо всем этом думаю. Вскоре выяснилось, что он не меньший митчельянец, чем я, и что мы думаем с ним одинаково: открыт новый тип фотосинтеза, где вместо хлорофилла работает бактериородопсин.

Из Нью-Йорка я отправился в Итаку, к Э. Ракеру, и рассказал ему о данных Стокениуса. По реакции собеседника я понял, что все это он слышит впервые. Помнится, у меня даже были сомнения, имею ли я право рассказывать о бактериородопсине без разрешения Стокениуса, и я даже порывался позвонить ему в Сан-Франциско. Но Ракер отговорил меня, сказав, что сейчас в Калифорнии четыре часа утра и вряд ли Стокениус будет в восторге от звонка.

А пять месяцев спустя Ракер уже докладывал на очередном международном биохимическом конгрессе о своей совместной работе со Стокениусом. Это был знаменитый «опыт с химерой».

Ракер и Стокениус взяли АТФ-синтетазу из митохондрий сердца быка, бактериородопсин из галофильных бактерий и фосфолипиды из соевых бобов и получили новый тип протеолипосом, составленных из веществ всех трех царств живого мира: животного, бактериального и растительного. Протеолипосомы при освещении синтезировали АТФ.

Бычья АТФ-синтетаза катализировала фотофосфорилирование! Это был результат, чудовищный с точки зрения сторонника химической или конформационной схемы сопряжения.

Даже самым яростным противникам хемиосмотической теории было ясно, что бактериородопсин не может образовывать каких-либо химических соединений — предшественников АТФ. Не могла идти речь и об обмене конформационной энергией между бактериородопсином и бычьей АТФ-синтетазой. Для этого потребовался бы тесный контакт двух названных белков, а было известно, что бактериородопсин занимает обширные участки (бляшки до 0,5 микрона в длину) в мембране бактерии, причем никаких других белков в этих бляшках не обнаруживается. Бактериородопсин делает свое дело без помощников.

«Оппозиция сдается!» — писал мне в эти дни из Америки П. Хинкль.

Да, опыт Ракера и Стокениуса был воистину по-



следней каплей, склонившей чашу весов в пользу хемиосмотической гипотезы.

В те дни мне довелось посетить Митчела в его Глинн Хаузе. Помню покрытые нежнейшей, только что взошедшей травой холмы, аллею вечнозеленых деревьев, ведущую к дому, и сам дом: освещенная жилая часть и затемненные лабораторные комнаты. В те январские дни 1974 года Англия пыталась бороться с энергетическим кризисом, сократив рабочую неделю. Митчел был этим страшно недоволен и грозился поставить на ближайшем холме ветряк, чтобы стать независимым от государственной энергетики.

Мне отвели большую комнату с нереально высоким потолком и огромными окнами, за которыми дремал сад. Был полный штиль.

Пытаясь уснуть, я обратил внимание на боль в ушах. Меня охватило какое-то беспокойство. Что-то было не так. Я не сразу сообразил, что все дело в тишине. В доме было абсолютно тихо. На милю вокруг ни жилья, ни шоссе, ни железной дороги. Я понял, что, пожалуй, впервые в жизни нахожусь в полной тишине. Пришло на ум, что Г. Лундегард, предтеча Митчела, тоже жил в уединенном доме, где размещалась его лаборатория... Уснуть мне удалось, лишь положив под голову ручные часы.

ПРИЗНАНИЕ

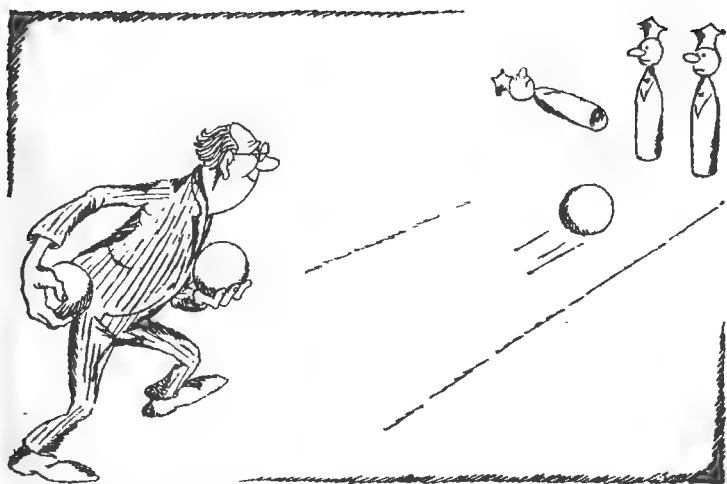
ПРИНЦИП МИТЧЕЛА

В хронологии своих встреч с Митчелом я обнаружил правильную периодичность: познакомившись в 1966-м, мы затем виделись раз в два года, по четным годам. Лишь после 1974 года наступил четырехлетний перерыв, и автора хемиосмотической гипотезы я повстречал вновь только в 1978-м, на съезде в Дрездене, где ему вручали высшую награду Федерации европейских биохимических обществ — медаль Г. Кребса. Это был уже не первый знак официального признания. За два-три года Митчел стал членом Королевского общества Великобритании, получил золотую медаль международного научного фонда CIBA, премию Филдберга, а также и другие премии в Бостоне, в Нью-Йорке.

Свою лекцию перед европейскими биохимиками в Дрездене он мог, казалось бы, выдержать в спокойных тонах, популярно изложив суть своей уже доказанной и всемирно знаменитой гипотезы. Так нет же, он вновь, как и прежде, перегрузил доклад чрезмерным обилием идей и фактов. чтобы в конце неистово обрушиться на М. Викстрема, А. Ленинджера и кое-кого из других биоэнергетиков, теперь уже занятых, по существу, разработкой деталей его теории.

Речь шла о механизме образования и использования протонного потенциала в биологических мембранах. Согласившись с тем, что протонный потенциал есть фактор, сопрягающий дыхание и фосфорилирование, биоэнергетики занялись исследованием устройства ферментов, образующих протонный потенциал. Посыпались самые различные предложения: каждый имел наготове свой собственный «чертеж» белка — генератора электроэнергии. Вот тут-то фигура Митчела вновь оказалась в самом центре полемики.

Дело в том, что еще в 1966 году, в первой «Серой книге» он имел неосторожность дать конкретные схемы главных узлов постулированного им механизма превращения энергии. Впоследствии Ракер счел это за достоинство и даже вывел некое правило, звучащее примерно так: «Если вы выдвинули блестящую новую гипоте-



зу, но не изложили ее в деталях, вас, вероятно, будут игнорировать. Если вы хотите привлечь внимание к своему детищу, без колебаний включите в изложение несколько пунктов, которые несущественны для главной темы, но зато могут быть атакованы оппонентами». Отсутствие резонанса от первой краткой публикации Митчела в 1961 году Ракер объясняет именно тем, что неясно было, как атаковать новую гипотезу.

Нет слов, подробнейшее изложение теории, данное в 1966 году, было куда уязвимей для критики. Каждый мог найти здесь себе подходящую мишень: и специалист по АТФазам, и тот, кто занимался дыхательными ферментами, мембранолог и исследователь фотосинтеза, микробиолог и биофизик-теоретик.

Многие из деталей схемы Митчела, по-видимому, не универсальны для всех генераторов протонного потенциала, а некоторые вообще неверны. Однако главное было схвачено абсолютно верно: использование энергетических ресурсов ведет к образованию протонного потенциала, который расходуется затем на синтез АТФ.

Вот почему Митчел имеет право сегодня сказать словами булгаковского Мастера: «О, как я угадал! Как я все угадал!»

В общей форме утверждение, которое я бы назвал «принципом Митчела», можно записать так:

энергетические ресурсы клетки → протонный потенциал → АТФ.

Это один из фундаментальных законов, определяющих жизнедеятельность организмов, поскольку он лежит в основе двух важнейших процессов энергообеспечения клетки — фотофосфорилирования и дыхательного фосфорилирования. Поэтому трудно переоценить вклад Митчела в развитие современной биохимии, и, когда в октябре 1978 года радио принесло весть о решении Нобелевского комитета по химии присудить ему премию, я не был удивлен.

П. Хинкль, выступая на семинаре в нашей лаборатории спустя несколько дней после этого события, сравнил его с присуждением такой же премии биохимикам — соотечественникам Митчела двадцать лет назад. По меткому выражению Хинкля, идея протонного потенциала имеет такое же значение для биоэнергетиков, как концепция двойной спирали ДНК для молекулярных биологов, изучающих наследственность.

Вечером я пригласил Хинкля к себе в гости, и мы подняли тост за Питера Митчела, гения-одиночку XX века.

НОБЕЛЕВСКИЙ ЛАУРЕАТ

И вновь нарушился «периодический закон» моих встреч с Митчелом. Нового нобелевского лауреата я увидел уже на следующий, 1979 год. Это произошло в Детройте, где собралась конференция биоэнергетиков в связи со знаменательной для них датой — шестидесятипятилетием Э. Ракера.

Составители программы поставили доклад Митчела непосредственно перед моим. В тот день я очень опасался, что, сосредоточившись на предстоящем мне выступлении, упущу что-нибудь существенное из речи Митчела, всегда отличавшегося стремлением сказать за полчаса то, на что не хватило бы и целого часа. Однако тревоги оказались напрасными. За какие-то восемь месяцев, прошедших со встречи в Дрездене, Митчел изменился сильнее, чем за двенадцать предшествующих лет нашего с ним знакомства. Слава, всемирное признание сделали то, чего не смогло совершить время. Куда исчез торопливый докладчик, стремящийся выплеснуть на слушателей избыток новых идей и гипотез? С трибуны вещал почтенный метр, «оракул из Бодмина».

Впервые на моей памяти доклад Митчела не вызвал ни вопросов, ни обсуждения.

«Быть может, биоэнергетики оробели перед первым среди них нобелевским лауреатом?» — утешал я себя, размышляя о причине гробового молчания, последовавшего за выступлением Митчела. Однако, восстановив в памяти его доклад, я вынужден был признать, что на сей раз он просто не сказал ничего нового.

Из Детройта все направились в Канаду, в Торонто, где предстоял 11-й Всемирный биохимический конгресс. Один из симпозиумов назывался «Биоэнергетика». Его должен был открыть своим докладом Митчел. И вот я в зале отеля «Ройял Йорк». Председательствующий приветствует англичанина как нобелевского лауреата. Забитый до отказа зал (толпятся в открытых дверях, стоят в проходах) встречает овацией появление Митчела. Здесь и те, что отдали годы жизни доказательству хемиосмотической гипотезы, и те, кому до совсем недавнего времени она казалась фантазией, и просто люди, пришедшие взглянуть на триумф «золушки из ученых», как назвала Митчела в эти дни одна из канадских газет.

Я внимательно вглядываюсь в лица окружающих. Вот низкорослый, худой и остроносый немец, президент международной организации биоэнергетиков М. Клингенберг стоя аплодирует Митчелу. Но мне вспоминаются совсем другие времена. 1972 год, Амстердам, доклад Митчела. В первом ряду Клингенберг. Посреди лекции он внезапно встает и демонстративно покидает зал. Проходя мимо меня, он на миг задерживается и громким шепотом бросает:

— Я знаю, вы друг Митчела, так обучите его, ведь он безграмотен!

А вот Л. Эрнстер, профессор из Стокгольма, член Нобелевского комитета. Не с его ли легкой руки получил Митчел свою премию? Многие годы Эрнстер был сторонником старой химической гипотезы сопряжения, но уже в 1968 году я стал свидетелем его разговора с молодым голландцем К. Ван Дамом:

— Говорю тебе, Карел, все новое теперь от Митчела, вот и твоя работа по митохондриям тоже.

— Нет уж, Ларс, это мое, кровное, — петушится Ван Дам.

Эрнстер, мрачно рассматривая на просвет рюмку с коньяком, бросает:

— Врешь, не твое, Митчелово!

Там, дальше в зале, Дж. Мойл, постоянная сотрудница Митчела, поседевшая за опытами по доказательству его идей. Каждый день на крошечном старом автомобиле она отправлялась в Глинн Хауз из своей бедно обставленной квартирки в Бодмине, положив на пустующее сиденье рядом с собой сверток с бутербродами, чтобы в лаборатории не объесть, не дай бог, за ланчем своего профессора.

Аплодисменты стихают. Митчел читает доклад. Это в общем тот же текст, что в Детройте. Лауреат не считал нужным извлечь урок из неудачи, постигшей его по ту сторону канадской границы. Не считал нужным? А если не смог? Нет, это уж слишком! В такое поверить нельзя, особенно мне, кому посчастливилось общаться с этим выдающимся человеком и видеть в действии всю мощь его интеллекта.

На следующий день мы встречаемся с ним в спокойной обстановке. Надо непременно посоветоваться о докладе, который мне предстоит завтра. Это не обычный доклад, даже вообще не доклад, а лекция, пленарная лекция перед всеми восемью тысячами делегатов конгресса. Такое бывает в жизни один раз, и кто, как не Митчел, может помочь мудрым советом. Но сначала волнующий меня вопрос.

— Какой сегодня ваш главный интерес?

— Пытаюсь добыть два миллиона фунтов стерлингов!

— ?

— Хочу основать в Бодмине университет. Да вот беда: все говорят, что мы умные, но денег не дают!

Поскольку в этой новой беде я Митчелу не помощник, перевожу разговор на свою работу.

— Вы читали мою гипотезу в «ФЭБС Леттерз» о роли натрия-калиевого градиента?

— Конечно, читал, Влади (Митчел почему-то именно так сократил мое имя). Ваша гипотеза напоминает банковскую операцию, когда... — Тут началась такая финансовая премудрость, которая была явно за пределами моих познаний в английском языке и в этой не актуальной для меня сфере человеческой деятельности.

Митчел возбудился, в его глазах снова возникли ис-



корки, которые я так любил наблюдать в прошлые годы, но внезапно из глубин памяти всплыла картина совсем другого рода.

...Митчел в Глинн Хаузе за завтраком. Ему приносят почту: письма, несколько научных журналов, справочник английских яхт-клубов (Митчел хоть и не чемпион, но заядлый яхтсмен) и пачку свежих газет. Он быстро и безошибочно выхватывает из всей этой кипы газету на розовой бумаге и погружается в чтение, забыв об остывающем в чашке ароматном кофе. Розовый бумажный лист хрустит и мнется в его нервно сжимающихся пальцах. Я читаю название газеты, которому в верхней части листа нехотя уступили место бесконечные столбцы цифр: «Файнэншл таймс».

Когда Митчел купил Глинн Хауз, он приобрел заодно пять миль земли по правому берегу реки Фой. Потом выяснилось, что в Корнуэлле владение берегом еще не дает права ловить в реке рыбу, и он отдельно за какую-то страшную сумму купил право на рыболовство. Однажды, проснувшись утром, он подумал, как это будет ужасно, если какой-то фабрикант построит заводик напротив его дома, и купил противоположный берег. Отпуск он решил проводить на Эгейском море и приобрел там большой кусок одного из греческих островов. Хобби Митчела — старинные замки, что он скупает и восстанавливает в Корнуэлле, — тоже, видимо, стоит де-

нег немалых. А деньги любят счет, даже если ты получил от дядюшки несметное богатство. Вот что заставляет Митчела предпочесть газету финансистов из Сити любому другому чтению за утренним кофе...

Так было еще до премии. Что же удивительного, если теперь, увенчанный высшей наградой, он окончательно погряз в финансовых делах, оправдываясь идеей основать собственный университет. И я подумал: «Не приведи господь найти тебе еще и эти два миллиона фунтов, что требуются для университета. Ведь тогда уже не избежать всех последствий действия неумолимого закона Паркинсона!»

В этот вечер в Торонто я так и не смог обсудить с ним волновавших меня проблем. Я был убит: мне не о чем разговаривать с Митчелом! Впервые мы расстались, не наметив места и срока следующей встречи.

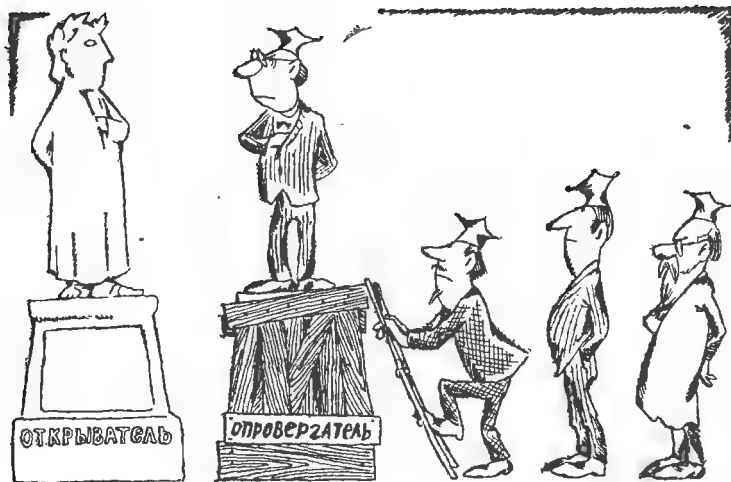
С Митчелом я больше не виделся. Год спустя он прислал мне отгиск своей новой небольшой работы по регуляции АТФ-синтезаы в хлоропластах. Среди авторов статьи были неизвестные имена, а под заглавием значилось: Глинновский исследовательский институт. Может быть, Митчел удовлетворил свои амбиции простейшим способом, переименовав лабораторию в институт, чтобы вновь взяться за свое настоящее дело? И как бы в подтверждение этой мысли я получил вскоре письмо от П. Хинкля: Митчел направил куда-то запрос о финансировании новой программы опытов с цитохромоксидазными протеолипосомами.

«Я наконец остался в полном одиночестве, но это лишь укрепляет меня в вере, что я прав!» — писал Митчел Хинклю по поводу своей старой схемы, объяснявшей устройство одного из дыхательных генераторов протонного потенциала.

Я облегченно вздохнул: это почерк прежнего неистового Митчела, готового дать бой за любую свою идею на уже, казалось бы, незащитимом рубеже.

АРОМОРФОЗЫ В НАУКЕ И «КОМПЛЕКС ГЕРОСТРАТА»

Статью об истории биоэнергетики Ракер назвал «От Пастера до Митчела». О чем же говорит, что дает эта история? В общем, то же, что и анализ развития любой другой науки. Сначала накопление фактов, затем догадка о закономерности, призванной их упорядочить,



и объяснить, всеобщее отрицание новой гипотезы, затем открытие новых предсказанных ею фактов и как результат принятие гипотезы, после чего она именуется уже теорией или законом.

За последние полвека в нашей области было несколько подобных периодов, связанных с именами таких первооткрывателей, как Ломан и Липман (АТФ и его роль в энергетике), Энгельгардт (дыхательное фосфорилирование и АТФаза миозина), Кребс (цикл карбоновых кислот) и, наконец, Митчел (протонный цикл).

Наш замечательный биолог-эволюционист академик А. Северцов, анализируя историю возникновения современных организмов, ввел понятие ароморфоза. Ароморфоз — это такое изменение структуры живого существа, которое позволяет ему захватить новый обширный ареал. Выход водных позвоночных на сушу, то есть переход от рыб к земноводным, или завоевание воздушного океана с появлением птиц, — вот типичные примеры ароморфоза. За ароморфозом следуют другие структурные изменения, призванные обеспечить наилучшее приспособление к новой среде обитания и проникновение в ее специфические ниши. Эти явления Северцов называл идиоадаптацией. За ароморфозом всегда следует множество идиоадаптаций, одна из которых в конце концов может оказаться предтечей нового ароморфоза.

Нечто подобное происходит и в эволюции научной мысли. В этом смысле создание хемиосмотической гипотезы, приведшей к доказательству протонного цикла, можно сравнить с ароморфозом.

Следовательно, на вопрос, что предстоит биоэнергетике в ближайшем будущем, мы вправе ответить: разработка деталей новой теории, ее многочисленных следствий и конкретных вариантов, реализуемых различными типами биологических систем. И где-то на одном из этих путей нас ждет новый ароморфоз — прорыв на следующий горизонт знаний.

Таков, так сказать, долгосрочный прогноз. А пока мы имеем перед собой весь спектр явлений, сопутствующих успеху: резкий рост популярности победившей идеи в смежных областях науки и околонаучных сферах, появление моды на ранее гонимое направление, а также бесплодные попытки разрушить вновь созданный «интеллектуальный собор».

Эту последнюю тенденцию я бы назвал «комплексом Герострата». Прославиться тем, что ты сжег храм Артемиды Эфесской — вот ярчайший пример деяний честолюбца, не способного к созиданию. В науке такие люди, как правило, действуют вполне безнаказанно, окруженные ореолом смельчаков, бросивших вызов общепринятому мнению, и симпатиями вчерашних противников недавно победившей гипотезы. Иногда им удается прорваться на страницы центральных научных журналов, что порождает цепь ответных публикаций, которая вскоре пресекается ввиду бесплодности дискуссии.

В биологии «комплекс Герострата» может расцвести особенно пышно из-за сложности и огромного многообразия объектов исследования. Допустим, перед вами сообщение о новом, не виданном ранее штамме какой-нибудь экзотической бактерии, и автор утверждает, к примеру, что фотофосфорилирование в этом случае обходится без мембран и потому не может быть понято в рамках концепции протонного потенциала. Что это — прецедент, ниспровергающий, казалось бы, доказанную закономерность? Или, может быть, артефакт, а то и вовсе результат научной недобросовестности?

Так сразу на этот вопрос не ответишь, и, если редакция журнала решается отказать такому автору в публикации, он громко жалуется на несправедливость и «Митчелов терроризм».

Успехи биоэнергетики породили моду на это слово, которое иногда стали применять в самых неожиданных и неподходящих случаях.

— Вы пойдете сегодня на лекцию о биоэнергетике? — спросил меня сотрудник Карадагской биостанции. — Читает заезжий специалист из Балашихи.

Биоэнергетика — моя специальность, и я в общем-то представляю себе, кто и где у нас занимается этой наукой. Но ни фамилия лектора, ни название подмосковного городка не вызвали никаких ассоциаций. Удивительно, как я упустил из виду своего балашихинского коллегу?

— А чем он занимается в биоэнергетике?

— Он йог.

Так вот в чем дело! Ситуация сразу прояснилась. Федот, да не тот!

И все же я пошел на лекцию, хотя заранее знал, что ее смысл будет так же далек от биоэнергетики, как полюс от солнечного Карадага.

В одной из комнат белого здания биостанции, где шум прибоя и свежий ветер врываются в открытые окна, собралось человек сорок, в основном, как и я, отпускники. Вышел лектор, пожилой, но еще очень бодрый загорелый человек. Из-под клочковатых бровей — пристальный взгляд гипнотизера или скорее даже проповедника. Да и лекция — не научный доклад, а проповедь о том, как пробудить тайные могучие силы, дремлющие в каждом из нас, направить по своей воле ступок особой «биологической энергии» (вот она, биоэнергетика!) в любую часть нашего тела или даже за его пределы: к другим людям, животным или неодушевленным предметам.

И если в речи коллеги из Балашихи и были научные термины и логические построения, то они звучали как дань времени, когда все верное должно быть научно обосновано. И напрасно было спрашивать докладчика, как доказывается, например, его утверждение, что энергия солнца может прямо, без посредников, усваиваться человеческим организмом для пополнения «биологической энергии». В религии нужна вера, а не аргументы. Уже само стремление доказать ее догму — ересь.

Глядя на лица слушателей, я поймал себя на мысли, что большинство этих людей пришло сюда за верой.

Атеизм требует от человека смелости. Ведь приходится жить с сознанием того, что некого просить о защите от игры слепого случая. Культ бога или живого кумира или хотя бы вера в знамения и приметы облегчает бремя страха перед случаем. Помогает создать удобную иллюзию, что исполнение нехитрого ритуала и соблюдение известных правил хотя бы отчасти защитит человека перед лицом внешнего мира, способного в миг уничтожить ваше благополучие, каким бы прочным оно ни казалось минутой раньше. В нашем обществе с его традиционным атеизмом любая религия, закамуфлированная под науку, имеет шанс найти свой круг приверженцев.

И раньше-то с йогой непросто было разобраться широкой публике. Религия? Философия? Или особая физкультура? А теперь оказывается еще и незаслуженно забытое направление науки, да такое, что претендует стать над современной физикой, биологией и медициной.

Однако назвать себя «сверхбиологами» или «сверхбиофизиками» проповедники не решаются: будет нескромно. «Парапсихологами»? Но приставка «пара» (около) несовместима с амбицией любого верования. Так как же определить эту загадочную сферу деятельности, где оперируют без ножа, исцеляют на расстоянии, поднимают предметы, не прикладывая рук, и жестами заставляют распускаться бутоны цветов?

А что, если — «биоэнергетика», раз уж речь идет о некой особой форме энергии, присущей живым существам?

Простите, но место занято! Наука биоэнергетика уже есть.

ЧАСТЬ II

БИОЭНЕРГЕ- ТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ



МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЭЛЕКТРОСТАНЦИИ

ПРОТОННАЯ АТФ-СИНТЕТАЗА

Одна из совершенно новых задач, поставленных теорией протонного потенциала, — это выяснение вопроса о том, как устроены белки — генераторы тока.

Такого типа белки играют ключевую роль в превращениях энергии мембранными системами клетки. Большинство из них представляют собой давно описанные ферменты: переносчики электронов по дыхательной и фотосинтетической цепям ферментов и мембранные АТФ-синтетазы. Хемиосмотическая гипотеза лишь выявила их биологическую функцию, ответив на вопрос, что происходит с энергией, выделяющейся при реакциях, катализируемых этими ферментами.

Биохимики, изучавшие такие ферменты задолго до Митчела, и не подозревали, что имеют дело с одним из самых поразительных изобретений живой природы — молекулярными электростанциями. После утверждения новой теории они с досадой обнаружили, что оказались в положении мольеровского героя, который не знал, что всю жизнь говорит прозой.

Однако сам факт, что ферменты дыхания, фотосинтеза, а также определенные АТФ-синтетазы играют роль генераторов тока, еще ничего не может сказать о механизме их действия. А ведь тут есть чему удивиться и над чем задуматься. По существу, перед нами действительно миниатюрные электростанции молекулярных размеров. Толщина мембраны, куда встроен белок-генератор, около 70 ангстрем, или 7 миллионных долей миллиметра. В мембрану вмонтирована молекула белка, причем сделано это таким образом, что противоположные концы белковой молекулы выходят на поверхность мембраны с двух разных сторон. Например, протонная АТФ-синтетаза состоит из двух частей: грибовидного выроста, который смотрит в воду внутрь митохондрий, и цилиндра, пронизывающего толщу мембраны. Основание цилиндра прикреплено к грибовидному выросту, а его верхняя часть вынесена на другую сторону мембраны, то есть в воду, находящуюся снаружи митохондрий.



Грибовидный вырост протонной АТФ-синтетазы можно увидеть под электронным микроскопом, если обработать обрывки митохондриальных мембран веществом-контрастером, поглощающим электроны гораздо сильнее, чем это делают мембранный белок или липид. В этих условиях мембрана выглядит под электронным пучком светлой, а окружающее ее пространство — черным.

Чтобы получить изображение АТФ-синтетазы, нашей сотруднице Л. Бакеевой пришлось использовать практически предельное увеличение, которое позволяет дать электронный микроскоп (около одного миллиона раз). Полученный негатив был затем увеличен еще втрое при изготовлении позитива с электронно-микроскопического снимка. В итоге же изображение оказалось в 3 миллиона (!) раз крупнее действительной величины фотографируемого объекта. Уже одно это число красноречиво свидетельствует, сколь малые размеры выбрала живая природа, создавая биологический генератор тока. А ведь протонная АТФ-синтетаза отнюдь не самый маленький белок-генератор. Бактериородопсин в 20 раз мельче.

Грибовидные выросты на мембране митохондрий были впервые описаны в 1962 году американским мик-

роскопистом Х. Фенаидес-Мораном. Д. Грин немедленно отреагировал на это открытие гипотезой о том, что в выростах локализируются дыхательные ферменты. Оснований для подобного предположения у него не было, и сейчас уже невозможно понять, что толкнуло автора на поспешную публикацию.

Э. Ракер и Б. Чанс взялись проверить гипотезу Грина. Оказалось, что обработка фрагментов митохондрий мочевиной приводит к исчезновению «грибов». Чанс измерил (на особом спектрофотометре собственного изобретения) поглощение света мембранами, обработанными мочевиной, и обнаружил в них полный набор дыхательных ферментов, благо все они окрашенные белки с характерными спектральными максимумами. Значит, гипотеза Грина не проходит.

Тогда Ракер решил посмотреть, как обстоит дело с ферментами фосфорилирования. Его логика была примерно такова: раз в «грибах» нет ферментов дыхания, то скорее всего должны быть ферменты фосфорилирования, поскольку эти две группы ферментов — самые массовые в митохондриях. То, что речь идет о каком-то массовом ферменте, было ясно уже из простого просмотра микрофотографий. «Грибов» на мембране такое количество, что между двумя соседними невозможно уместить третий.

В первых же опытах выяснилось, что мембраны, лишенные «грибов», не способны ни к фосфорилированию АДФ, ни к дефосфорилированию АТФ. Стало быть, действительно «грибы» — какая-то деталь фосфорилирующего механизма митохондрий. Но что же происходит с «грибами» под воздействием мочевины?

Известно, что мочевина нарушает многочисленные временные связи, возникающие внутри белков и между белками. Если «гриб» держится за мембрану за счет таких связей, есть шанс, что мочевина не разрушает «грибы», а просто отделяет их от мембраны. Тщательный просмотр микрофотографий убедил Ракера, что в растворе, где находились фрагменты митохондрий, после добавления мочевины появляются сферические частицы диаметром около 85 ангстрем. Центрифугирование всей этой смеси в течение часа при ускорении, в 100 тысяч раз превышающем силу земного тяготения, привело к ее разделению на осадок (в нем были фрагменты мембран) и надосадочную жидкость, содержащую сфери-

ческие частицы. Их удалось осадить добавлением соли.

Так в руках Ракера оказалась чистая фракция «грибов». Как показали последующие опыты, «грибы» с большой скоростью расщепляли АТФ до АДФ и фосфата. Более того, добавив «грибы» к обработанным мочевиной мембранам, ученый обнаружил, что на мембране вновь появились грибовидные выросты. При этом возвратилась способность к синтезу АТФ, сопряженно с дыханием.

Определение массы «гриба» показало, что она порядка 385 килодалтон, или в 385 тысяч раз больше массы атома водорода. «Гриб» оказался составленным из нескольких индивидуальных белков с массами от 10 до 55 килодалтон. Еще несколько белков с общей массой порядка 100 килодалтон было обнаружено в мембранной части протонной АТФ-синтетазы. Эти последние нужны для прикрепления «гриба» к мембране и переноса протонов через мембрану. Таким образом, суммарная масса одной молекулы митохондриальной АТФ-синтетазы оказалась чуть меньше 500 килодалтон.

Как же работает этот довольно сложный и внушительный по молекулярным масштабам агрегат?

Рассмотрим сначала реакцию, когда расщепление АТФ ведет к генерации протонного потенциала. Простой опыт показывает, что АТФ взаимодействует первоначально с «грибом», а не с мембранным сектором белкового генератора. Если к митохондриям добавить АТФ, то он не расщепится, пока не пройдет через мембрану и не окажется внутри митохондрии, куда обращены грибовидные выросты.

Ясно также, что гидролиз АТФ происходит в «грибах», поскольку белки мембранного сектора с АТФ не взаимодействуют. Зато они способны к переносу протонов. Эта их активность может быть продемонстрирована, так сказать, в чистом виде на мембранах, лишенных «грибов». Такие мембраны свободно пропускают ионы H^+ , причем добавление «грибов» блокирует эту протонную проводимость. Можно нарушить проводимость другим путем — добавлением олигомицина. Кроме того, этот антибиотик прекращает как синтез, так и гидролиз АТФ в исходных мембранах, но не влияет на гидролиз АТФ «грибами», отделенными от мембраны.

По-видимому, мембранные белки АТФ-синтетазы об-

разуют проводящий протоны канал, который связывает «гриб» с противоположной (наружной) стороной мембраны митохондрии. «Гриб», как пробка в графине, закрывает выход из канала на внутренней стороне мембраны. После удаления «гриба» канал становится сквозным, связывая между собой вне- и внутримитохондриальные пространства. Олигомицин нарушает работу канала.

Если «гриб» отделен от мембраны и свободно плавает в воде, то гидролиз АТФ не может привести к созданию протонного потенциала просто из-за отсутствия мембраны, разделяющей пространство на два изолированных отсека.

Если «гриб» прикреплен к мембране и состыкован с каналом, то гидролиз АТФ сопровождается переносом протонов из митохондрии наружу.

Проще всего этот процесс можно представить себе следующим образом. Внутри митохондрий АТФ связывается с «грибом», переносится куда-то в глубь мембраны и там расщепляется на анионы АДФ и фосфата (АДРО^- и $-\text{ОР}$):

$\text{АДРОР} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{АДРО}^- + -\text{ОР} + 2\text{H}^+$,
где АТФ обозначен как АДРОР.

Затем ионы H^+ выделяются в канал и выходят наружу, а АДРО^- и $-\text{ОР}$ переносятся внутрь митохондрии и там связывают протоны:



Процесс в целом описывается уравнением:



Реакция гидролиза АТФ сопровождается выделением энергии. Поэтому сопряженный с ней перенос ионов H^+ изнутри митохондрий наружу получает возможность идти в энергетически невыгодном направлении, создавая внутри нехватку ионов H^+ и положительных зарядов. Эта нехватка должна возрастать по мере того, как все новые молекулы АТФ гидролизуются митохондрией.

Значит, чем дольше работает АТФазный генератор, тем труднее ему переносить ионы H^+ через мембрану. В конце концов генератор выключится вовсе. Это произойдет в момент, когда выигрыш в энергии от гидролиза уравнивается с проигрышем в энергии, сопутствующим

щим переносу ионов H^+ против электрического поля из отсека, где ионы H^+ в дефиците, в отсек, где они в избытке.

Если теперь включить какой-нибудь другой протонный генератор, откачивающий ионы H^+ из митохондрий, например, за счет энергии дыхания, то митохондриям окажется выгоднее впускать внутрь ионы H^+ , синтезируя АТФ, чем выталкивать ионы, гидролизую АТФ. Другими словами, итоговая реакция, приведенная выше, изменит направление и потечет справа налево. Гидролиз АТФ сменится его синтезом, то есть возникнет процесс дыхательного фосфорилирования.

Таковы общие черты устройства протонной АТФ-синтетазы. Однако существенные детали этого механизма все еще остаются неясными, затрудняя выбор между несколькими возможными схемами, призванными описать принцип его работы.

Один из ключевых вопросов — это как, каким способом АТФ, АДФ и фосфат переносятся из водной фазы митохондрии в гидрофобную фазу митохондриальной мембраны, чтобы попасть в сферу действия электрического поля?

АТФ, АДФ и фосфат — это весьма гидрофильные многозарядные анионы. Их сродство к воде очень велико, а к липиду — ничтожно. Чтобы помочь этим веществам перейти из воды внутрь мембраны, необходимо какое-то специальное приспособление. Что бы это могло быть?

Помня, каким скользким может быть путь аналогий, мы тем не менее рискнем обратиться к другой белковой системе, также присутствующей в митохондриальной мембране и имеющей дело с АТФ и АДФ. Я имею в виду так называемый АТФ/АДФ-антипортер.

М. Клингенбергом был получен в чистом виде и подробно исследован мембранный белок массой 30 килодальтон, способный обменивать содержащийся в митохондриях АТФ на внемитохондриальный АДФ (этот процесс обозначается термином «антипорт»). Выяснилось, что у антипортера есть два места связывания АТФ и АДФ. Белок закреплен в мембране таким образом, что эти два места обращены в воду по разные стороны мембраны. Если к белку на внутренней поверхности мембраны присоединяется АТФ, а на внешней — АДФ, то молекула белка поворачивается на

180 градусов или совершает какое-то более сложное движение, в результате которого участок белка с АТФ появляется снаружи митохондрии, а участок с АДФ — внутри.

Поворот в обратном направлении затрудняется электрическим полем, генерируемым на мембране митохондрий за счет дыхания. Дело в том, что АТФ несет на себе четыре отрицательных заряда, а АДФ — только три. Обмен наружного АТФ⁴⁻ на внутренний АДФ³⁻ означал бы перенос внутрь митохондрии отрицательного заряда против электрического поля. В то же время обратный процесс должен идти по полю, которое может быть движущей силой такого обмена.

Мой коллега И. Козлов выдвинул предположение, что та часть АТФ-синтетазы, которая имеет дело с АТФ, АДФ и фосфатом, устроена по принципу АТФ/АДФ-антипортера.

Предполагается, что в АТФ-синтетазе есть два места связывания субстратов реакции. Одно из них обращено в водное пространство внутри митохондрии, другое погружено в мембрану.

Согласно гипотезе при синтезе АТФ происходит антипорт АТФ⁴⁻/ (АДФ³⁻ + PO_4^{3-}) между двумя местами связывания. Если рассчитать суммарный баланс переносимых при таком антипорте заряженных групп, то окажется, что из воды внутрь мембраны перенесены два отрицательных заряда. Электрическое поле, генерируемое на мембране дыхательными ферментами (минус внутри митохондрий), способствует антипорту АТФ⁴⁻/ (АДФ³⁻ + PO_4^{3-}): поле должно удалять АТФ из внутримембранного места связывания, заменяя АТФ на АДФ и фосфат.

Приняв, что синтез АТФ из АДФ и фосфата происходит именно во внутримембранном месте связывания, мы можем объяснить, каким образом поле, создаваемое дыханием, смещает равновесие системы АДФ + фосфат $\rightleftharpoons$ АТФ в сторону синтеза АТФ. Поле как бы концентрирует АДФ и фосфат в каталитическом центре АТФ-синтетазы и откачивает оттуда образующийся продукт (АТФ).

Другой «приводной ремень» этого механизма — транспорт протонов.

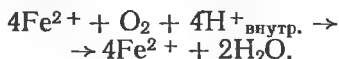
Предполагается, что 2H^+ , фигурирующие в левой части уравнения, поступают в каталитический центр

АТФ-синтетазы из водной среды, окружающей митохондрию. Транспорт протонов происходит по полю (в сторону заряженного отрицательного внутреннего объема митохондрии). Тем самым одна и та же сила: разность электрических потенциалов — способствует тому, что к каталитическому центру АТФ-синтетазы с одной стороны мембраны устремляются АДФ и фосфат, а с другой стороны — ионы H^+ .

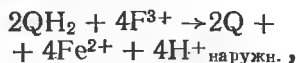
Эта схема непротиворечиво объясняет всю совокупность сведений об АТФ-синтетазе, однако было бы ошибкой считать ее доказанной. Пока она лишь рабочая гипотеза; иллюстрирующая, как мог бы работать один из важнейших мембранных преобразователей энергии.

ЦИТОХРОМОКСИДАЗА

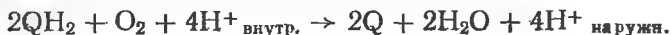
Протонный потенциал, приводящий в движение механизм синтеза АТФ, генерируется ферментами дыхания. Среди них наиболее изучена цитохромоксидаза, последний фермент дыхательной цепи. Цитохромоксидаза катализирует окисление восстановленного цитохрома с кислородом. При этом ион двухвалентного железа (Fe^{2+}), входящий в состав цитохрома с, теряет электрон и превращается в ион трехвалентного железа (Fe^{3+}). Ионы H^+ , необходимые для образования воды, черпаются из внутреннего объема митохондрии:



Окисленный цитохром с восстанавливается вновь посредством предшествующего компонента дыхательной цепи — производного хинона (он называется убихинол, сокращенно QH_2). Процесс происходит таким образом, что ионы H^+ , выделяющиеся при этой реакции, остаются снаружи митохондрии:



где Q — окисленная форма убихинола, называемая убихиноном. Суммарная реакция окисления убихинола кислородом может быть записана так:



Регенерация QH_2 из Q осуществляется в конечном итоге за счет атомов водорода, отщепляемого от карбоновых кислот в цикле Кребса.

Итак, один акт восстановления молекулы кислорода до воды, катализируемый цитохромоксидазой, приводит к выделению четырех ионов H^+ по внешнюю сторону митохондриальной мембраны и к поглощению четырех H^+ по внутреннюю ее сторону.

В простейшем варианте цитохромоксидазного механизма, предложенном в свое время Митчелом, разделение зарядов этим ферментом обусловлено тем, что окисление убихинола происходит на внешней поверхности мембраны, после чего электроны переносятся через мембрану и восстанавливают кислород на противоположной, внутренней, поверхности мембраны. Однако впоследствии молодым финским биоэнергетиком М. Викстремом были поставлены опыты, показавшие, что механизм может быть более сложным. По Викстрему, потребление молекулы кислорода цитохромоксидазой сопровождается выделением не четырех, а восьми ионов водорода снаружи митохондрий.

Внешне опыт Викстрема выглядел весьма просто. К митохондриям добавляли восстановленный цитохром и измеряли кислотность среды. Оказалось, что среда закисляется, то есть митохондрии выделяют ионы H^+ . Закисление исчезает, если создать бескислородные условия или отравить цитохромоксидазу цианидом.

Такой результат не объяснялся схемой цитохромоксидазы, рассмотренной Митчелом. Ведь цитохром *c* — донор электронов, окисление его железа (Fe^{2+}) само по себе не может приводить к выделению ионов H^+ . Чтобы свести концы с концами, Викстрем предположил, что цитохромоксидаза переносит через мембрану не только электроны, но и протоны, причем потоки этих заряженных частиц направлены в разные стороны: электроны движутся внутрь, а протоны — наружу.

У Митчела цитохромоксидаза играет давно известную для нее роль окислительного фермента — переносчика электронов с той лишь особенностью, что электроны переносятся поперек мембраны.

У Викстрема цитохромоксидаза выполняет сверх того еще и совсем другую функцию, действуя как протонный насос.

Митчел немедленно атаковал Викстрема, увидев



в новой схеме ревизию своего механизма, который казался ему таким естественным.

Действительно, генерация протонного потенциала Митчеловой цитохромоксидазой есть прямое следствие химизма этого процесса. Если окисление убихинола и восстановление кислорода происходят по разные стороны мембраны, а цитохромоксидаза связывает эти две реакции, перенося через мембрану электроны, то прямым и неизбежным следствием такого процесса окажется накопление ионов H^+ снаружи митохондрий и их потребление внутри. Никакого специального устройства для генерации потенциала здесь не требуется. Достаточно уложить цитохромоксидазу поперек мембраны, как этот известный биохимикам уже 70 лет фермент автоматически становится генератором протонного потенциала.

С момента первой публикации хемиосмотической гипотезы Митчел и его сторонники всегда приводили цитохромоксидазу как наиболее наглядный пример фермента-генератора. И вот теперь, когда гипотеза Митчела в целом уже доказана, вдруг появляется вихрастый молодой парень из Хельсинки и заявляет в глаза основателю мембранной биоэнергетики:

— Ваш взгляд слишком упрощен. Цитохромоксидаза не только фермент, но и протонный насос!

Сначала Митчел третировал данные Викстрема как примитивный артефакт.

— Выделение протонов при окислении цитохрома *c*, — говорил он, — обусловлено взаимодействием продукта реакции с мембраной митохондрий.

В ответ на это возражение Викстрем заменил цитохром *c* искусственным донором электронов — ферроцианидом, который с мембраной не взаимодействует. Выделение H^+ сохранилось.

Тогда Митчел указал на другую возможность: не происходит ли в системе Викстрема окисление убихинола?

Викстрем возразил, что он обрабатывал митохондрии целым коктейлем ядов, которые должны были перекрыть все подходы к убихинолу. Чтобы окончательно отбросить возражение оппонента, Викстрем поставил опыты на цитохромоксидазных протеолипосомах, где убихинола вовсе не было. И вновь наблюдалось выделение ионов водорода. Правда, оно было меньше, чем в митохондриях, но уменьшение можно было легко объяснить разницей в размере митохондрий и протеолипосом (последние гораздо мельче).

— Что толку в объяснении? Эффект мал. Почему я должен в него верить? — высокомерно возразил Митчел.

Чтобы решить спор, я предложил Викстрему попытаться сделать большие протеолипосомы. Этот совет не вызвал у него энтузиазма.

— Большие протеолипосомы, конечно, лучше маленьких, но как их сделать большими?

Викстрему так и не удалось увеличить размер протеолипосом. Но совсем недавно эту проблему решил мелликанец М. Монтал. Он приготовил цитохромоксидазные протеолипосомы диаметром в десять раз больше митохондрий. Теперь дело за Викстремом: если он прав, должно быть массированное выделение водородных ионов при окислении ферроцианида в протеолипосом-гигантах.

Ожесточенная дискуссия между Митчелом и Викстремом, не прекращающаяся и по сей день, последние несколько лет заметно оживляла обстановку на собраниях биоэнергетиков.

Совсем недавно наметилась неожиданная возможность почетного для обеих сторон разрешения затянувшегося спора. У одного из видов бактерий обнаружили

необычную цитохромоксидазу, состоящую всего из двух белковых цепей (у митохондриального фермента их семь). По предварительным данным Г. Шаца из Швейцарии, эта «простая» цитохромоксидаза не закисляет среду при добавлении ферроцианида, хотя и образует протонный потенциал. Возможно, что этот фермент работает по Митчелу, а цитохромоксидаза митохондрий — по Викстрему. Можно предположить, например, что пять «лишних» белков митохондриальной цитохромоксидазы образуют протонные каналы, в то время как два белка, общих с ферментом из бактерии, отвечают за реакцию переноса электронов.

В этой связи надо указать на один момент, связанный с эффективностью цитохромоксидазного генератора. Схема Митчела при всей своей простоте страдает одним недостатком: КПД Митчеловой цитохромоксидазы менее 50 процентов. Механизм Викстрема сложнее, но зато почти вся энергия, выделяющаяся при окислительной реакции, используется для создания протонного потенциала.

Не исключено, что эволюция этой системы шла в направлении «от Митчела к Викстрему». Тогда бактерии с «простой» цитохромоксидазой используют примитивный (но, может быть, более устойчивый) механизм, а митохондрии — более сложную и совершенную систему.

Для окончательного решения этой проблемы необходимы детальные сведения об устройстве двух типов цитохромоксидаз.

Кое-что нам известно уже сегодня. Показано, что оба фермента содержат по два атома железа и по два атома меди, причем железо входит в состав гема, плоского органического макроцикла, подобного тому, что найден в гемоглобине крови. Именно атомы металлов участвуют в переносе электронов цитохромоксидазами. Для пяти из семи белков митохондриального фермента выяснена первичная структура, то есть последовательность аминокислот, составляющих белковую цепь. Для фермента из бактерий эта работа еще не начата.

Выяснена примерная топография фермента митохондрий (но не бактерий): показано, что некоторые из белков смотрят наружу митохондрий, другие внутрь, а третьи пронизывают мембрану насквозь. В целом цитохромоксидаза имеет вид буквы Y, причем «ножка» довольно сильно высунута из мембраны на внешней ее стороне, а

кончики «рогов» чуть выдаются в воду с противоположной, внутренней стороны мембраны. К «ножке» лепится небольшой белок цитохром *c*.

Пространственная структура бактериального фермента неизвестна.

Ни для того, ни для другого фермента неясен путь электрона. Известно лишь, что электрон поставляется цитохромом *c* (Fe^{2+}) на внешней поверхности мембраны. Затем он передается, как по эстафете, от одного атома железа или меди к другому вплоть до кислорода. Мы не знаем ни точной локализации атомов железа и меди в мембране, ни того места, где происходит восстановление кислорода. Загадкой остается и путь протонов, необходимых для образования воды при восстановлении кислорода.

Эта последняя проблема была исследована нашим сотрудником А. Константиновым. Он поставил ряд остроумных опытов, призванных ответить на вопрос, изменится ли характер взаимодействия цитохромоксидазы с протонами при появлении электрического поля на мембране митохондрий. Не вдаваясь в детали экспериментов, скажу лишь, что влияние поля было обнаружено. Оно оказалось таким, как если бы ионы H^+ транспортировались из внутреннего пространства митохондрий в толщу мембраны на некую глубину. По-видимому, именно там, в глубине мембраны, и происходит передача протонов на молекулу кислорода, получившую электроны от цитохромоксидазы.

Вот, пожалуй, и все то существенное, что можно сказать об устройстве цитохромоксидазного генератора. Как видно, ситуация здесь не многим отличается от той, в которой находятся исследования по АТФ-синтетазе: мы все еще далеки от создания точного чертежа этих загадочных преобразователей энергии.

ХЛОРОФИЛЛЬНЫЕ ГЕНЕРАТОРЫ

Цитохромоксидаза — пример фермента, генерирующего протонный потенциал за счет энергии, которая освобождается при окислительной реакции. Аналогичный механизм участвует также в преобразовании энергии при фотосинтезе.

Раньше под фотосинтезом понимали процесс образования сахара из углекислоты и воды с использованием энергии света. Однако развитие исследований в этой

области за последние тридцать лет заставляет видоизменить такое определение фотосинтеза.

В начале 50-х годов было открыто фотофосфорилирование — синтез АТФ за счет энергии света в хлоропластах. Энергия АТФ у растений, как и у любых других живых организмов, может использоваться не только для синтеза углеводов, но также и для многих других целей.

Затем выяснилось, что усвоение света бактериями может протекать вообще без синтеза сахаров, ограничиваясь образованием АТФ.

А в самое последнее время были описаны мутантные формы фотосинтезирующих бактерий, не образующих ни сахар, ни АТФ. В этом случае превращение энергии света обрывалось на стадии генерации протонного потенциала, который уже не мог использоваться для синтеза АТФ. Это не значит, однако, что протонный потенциал, а стало быть, и свет вовсе бесполезны для такой бактерии: они могли бы поддерживать транспорт веществ через мембрану, вращение жгутиков и другие потребляющие энергию протонного потенциала процессы.

Учитывая новейшие открытия биоэнергетиков, под фотосинтезом надо понимать не только синтез сахаров, но также и любое другое использование энергии света для целей энергообеспечения живой клетки.

Универсальным биологическим преобразователем световой энергии служит фотогенератор протонного потенциала. Во всех известных сегодня случаях, кроме галофильных бактерий, фотогенератор улавливает свет молекулой пигмента хлорофилла (галофильные бактерии для этой цели используют ретиналь).

Хлорофилл — аналог гема, где вместо железа стоит атом магния. Хлорофилл всегда связан с особым мембранным белком. Хлорофилл-белковый комплекс составляет главный узел фотогенератора.

Более тридцати лет назад наш известный биохимик А. Красновский открыл важнейшее свойство хлорофилла — способность присоединять и отдавать электрон под действием света. Именно эти процессы, названные реакциями Красновского, как оказалось, лежат в основе работы белковых фотогенераторов, содержащих хлорофилл.

Рассмотрим одно из таких устройств — бактериальный хлорофилл-белковый комплекс. Это довольно сложный агрегат, состоящий из трех белковых цепей, четы-

рех молекул хлорофилла, двух молекул феофитина (феофитин во всем подобен хлорофиллу, кроме одного — в нем нет магния). Сверх того, комплекс содержит убихинон, связанный с белком через атом железа.

Поглощение кванта света одной из молекул хлорофилла приводит к его немедленному окислению. При этом хлорофилл теряет один электрон, который присоединяется к другим компонентам комплекса: сначала к феофитину, находящемуся в непосредственной близости от хлорофилла, а затем к убихинону.

На этом завершается процесс разделения зарядов в комплексе: хлорофилл приобретает положительный заряд, возникший из-за потери электрона, в то время как убихинон, присоединивший этот электрон, заряжается отрицательно. Оба этапа процесса переноса электрона протекают чрезвычайно быстро: первый занимает менее 10^{-11} секунды, второй — порядка 10^{-10} секунды. Следующие этапы процесса — перенос электронов на свободный (не связанный с железом) убихинон и восстановление хлорофилла цитохромом *c*. На это уходит 10^{-5} — 10^{-3} секунды.

Присоединив два электрона, убихинон связывает также и два протона, превращаясь в убихинол. Протоны (ионы H^+) черпаются из цитоплазмы, поскольку восстановление убихинона происходит вблизи той поверхности бактериальной мембраны, которая обращена внутрь клетки. Убихинол диффундирует на другую, внешнюю сторону мембраны и отдает электроны окисленному ранее цитохрому *c*. Окисление убихинола приводит к освобождению ионов H^+ снаружи клетки.

В результате на каждый квант поглощенного света через мембрану переносится один ион H^+ . Расчет показал, что КПД такой системы невысок — около 20 процентов. Однако бактериальная клетка располагает и другим, более сложным механизмом, когда на один квант переносится два водородных иона. Это сравнительно медленный процесс, включающий ряд промежуточных стадий с участием убихинона и цитохромов. Как предполагает В. Самуилов, два режима: быстрый, но менее эффективный и медленный, но экономичный — могут попеременно включаться в зависимости от условий существования бактериальной клетки.

До сих пор мы вели речь о фотосинтезе у бактерий. Давайте обратимся к аналогичному процессу в зеленых растениях. По существу, растительный фотосинтез есть

усложненный вариант бактериального. Начальные стадии двух этих процессов совпадают: поглощение светового кванта хлорофиллом, фотоокисление хлорофилла (реакция Красновского), затем восстановление пластохинона (аналога убихинона) и его окисление цитохромом.

Пока что идет все как у бактерий. Но уже следующая стадия оказывается иной. Вместо возвращения электрона с цитохрома на окисленный ранее хлорофилл происходят два совсем других процесса.

Один из них — расщепление молекулы воды на кислород, ионы H^+ и электроны. Именно этими электронами и восстанавливается окисленный пластохиноном хлорофилл. Что же касается цитохрома, то его электроны переносятся на другую молекулу хлорофилла, которая, так же как и первая, предварительно поглотила квант света и окислилась в реакции Красновского. Электрон, отнятый от хлорофилла при поглощении этого, уже второго по счету, кванта, переносится к углекислоте длинной цепочкой ферментов, участвующих в синтезе углеводов. В конечном итоге поглощение двух квантов света двумя разными хлорофиллами вызывает перенос одного электрона от воды к углекислоте.

Не менее существен и другой результат — перенос двух ионов H^+ через мембрану хлоропласта, в которой локализованы хлорофилл-белковые комплексы фотосинтетического аппарата. Механизм этого процесса генерации протонного потенциала еще ждет своих первооткрывателей.

Если сравнить системы, использующие свет у бактерий и растений, можно убедиться, что протонный потенциал — единственный первичный продукт циклической фотосистемы бактериального типа, в то время как нециклический фотосинтез растений не только генерирует протонный потенциал, но и служит поставщиком электронов. Эти электроны отнимаются от воды и используются при синтезе сахаров, из которых затем образуется крахмал. Тем самым фотосинтез растений выполняет функцию, противоположную той, которая присуща процессу дыхания: при фотосинтезе расщепляется вода, а образуются кислород и органические вещества. При дыхании органические вещества окисляются кислородом с образованием воды.

Накопив крахмал в течение дня, растительная клетка

окисляет его ночью. В результате усвоенная клеткой энергия Солнца может использоваться круглые сутки. Это несомненное преимущество растения перед бактерией-фотосинтетиком, неспособной к расщеплению воды и синтезу крахмала.

ФОТОСИНТЕЗ БЕЗ ХЛОРОФИЛЛА

Биофизик Ю. Владимиров
рассказал мне однажды, что

лет двадцать назад академик А. Красновский спросил как-то своих учеников:

— Какой самый простой признак фотосинтеза?

— Присутствие хлорофилла, — дружно ответили его молодые коллеги.

Догма о хлорофилле как неперменном участнике и главном действующем лице фотосинтеза продержалась в биологии ровно 60 лет: с момента открытия хлорофилла Р. Вильштеттером в 1913 году вплоть до 1973 года, когда были опубликованы результаты первых опытов Д. Остерхельта и У. Стокениуса о необычной энергетической системе одного из видов соелюбивых бактерий.

Как показали эти авторы, галофильная, то есть соелюбивая, бактерия *Halobacterium halobium*, живущая в насыщенном растворе хлористого натрия, закисляет среду при освещении, подобно тому как это делают фотосинтезирующие бактерии. Добавление разобщителя-протонофора полностью предотвращает закисление. Этот факт указывал на генерацию протонного потенциала.

Еще один вид бактерии-фотосинтетика? Допустим. Но есть ли у этого галофила хлорофилл?

Оказалось, что нет! Свет, вызывающий закисление среды, поглощался особым белком, похожим вовсе не на хлорофилл-белковые комплексы фотосинтезирующих бактерий и растений, а на зрительный пурпур, или родопсин, — белок, содержащийся в сетчатке глаза. Сходство пигмента соелюбивой бактерии и родопсина прежде всего в том, что и тот и другой представляют собой мембранные белки, окраска которых обусловлена остатком ретиналя (производного витамина А), присоединенного альдиминной связью к одной из аминокислот белковой цепи (к лизину).

Из-за сходства двух белков Остерхельт и Стокениус назвали свой пигмент бактериородопсином.

Открытию бактериородопсина суждено было сыграть совершенно особую роль в развитии биоэнергетики. По-

следовавшие затем события были столь значительными, что ниспровержение догмы о хлорофилле как обязательном участнике фотосинтеза (что само по себе, конечно, далеко не рядовое наблюдение) как-то отодвинулось на второй план.

Действительно, отсутствие хлорофилла у галобактерий — это исключение из правила, пусть первое, но все же исключение. Куда важнее, что бактериородопсин оказался примером совершенно нового типа генераторов протонного потенциала, простейшим в ряду подобных устройств и поразительно удобным для исследования.

Именно с бактериородопсином удалось поставить опыты, окончательно доказавшие справедливость хемиосмотической гипотезы Митчела (об этом мы уже рассказывали в первой части книги). Более того, изучая бактериородопсин, мы проникли глубже в тайну механизма протонных генераторов. Вот почему этот небольшой белок необычных бактерий, занявших в общем-то не слишком важную экологическую нишу в биосфере, вот уже десять лет привлекает к себе внимание биоэнергетиков всего мира.

Чем же так замечателен бактериородопсин?

Прежде всего своей простотой. Такие протонные генераторы, как АТФ-синтаза, цитохромоксидаза, хлорофилл-белковые комплексы, составлены из нескольких белковых цепей. Их молекулярная масса колеблется от 120 до 500 килодальтон. По существу, это сложные надмолекулярные агрегаты. Они столь велики, что не помещаются в мембране, далеко выдаваясь из нее в омывающую водную среду. В этой среде, а также в самой мембране есть множество других белков, причем некоторые из них образуют комплексы с белками-генераторами (связаны с ними в общих цепях и системах химических реакций или просто на правах ближайших соседей).

Бактериородопсин — это одна-единственная белковая цепь массой всего в 27 килодальтон. В мембране он занимает обширные участки, где нет других белков, а значит, и нет проблемы докучливых соседей, которые могут сопутствовать белку-генератору при его очистке. Да и сама процедура очистки до смешного проста: достаточно перенести галобактерии в воду из привычного для них насыщенного раствора поваренной соли, как связи между мембранными компонентами нарушаются и все содержимое клетки переходит в воду.

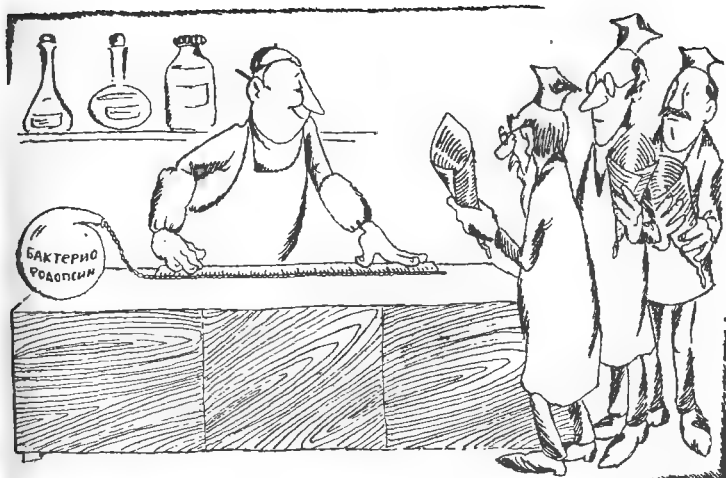
Все, кроме бактериородопсина. Области мембраны, занятые этим белком (так называемые фиолетовые бляшки), в воде не разрушаются из-за прочной кристаллической упаковки молекул бактериородопсина. Дело в том, что фиолетовая бляшка — это двумерный белковый кристалл, где молекулы бактериородопсина объединены в триады, а триады — в правильные шестиугольники.

Бляшки намного крупнее всех прочих компонентов смеси, которая на лабораторном жаргоне носит неблагозвучное название «шокат» (от слова «шок»; обработка клеток водой, ведущая к разрыву их оболочек, определяемая как осмотический шок). Достаточно отцентрифугировать эту смесь и промыть, как в ваших руках оказывается паста необычного фиолетового цвета. Определение химического состава пасты показывает, что она состоит на 75 процентов из бактериородопсина и на 25 — из фосфолипидов, заполняющих промежутки между молекулами этого белка. Других белков в пасте не обнаруживается, так что описанная выше нехитрая процедура дает 100-процентную очистку бактериородопсина от белковых примесей.

Те, кто сталкивался с необходимостью получить чистый фермент, могут оценить все преимущества работы с бактериородопсином. Почти всегда очистка фермента — это многостадийный процесс, каждый этап которого был когда-то подобран эмпирически методом проб и ошибок. По ходу очистки фермент может инактивироваться или изменить свои исходные свойства. Удаление примесных веществ часто далеко не безразлично для мембранного фермента, теряющего тем самым своих привычных партнеров по мембране. Все эти и подобные им проблемы просто не возникают, если вы имеете дело с бактериородопсином.

В довершение всего этот белок, как мы уже отмечали в одной из предыдущих глав, отличается чрезвычайной устойчивостью к повреждающим воздействиям: высокой температуре, кислотам, щелочам, фотоокислению и химическим окисляющим агентам. В холодильнике он может храниться годами без потери биологической активности.

Столь же стабильны фосфолипиды фиолетовых бляшек. Это простые эфиры фосфоглицерина и насыщенных жирных кислот с ветвящимися углеводородными цепями. Они гораздо устойчивей фосфолипидов обычных биоло-



гических мембран, содержащих лабильные (неустойчивые) сложноэфирные связи и какое-то количество ненасыщенных жирных кислот, подверженных перекисному окислению.

Стабильность бактериородопсина и его липидных партнеров обусловлена средой обитания бактерий: мало того, что *Halobacterium halobium* живет в насыщенной солевой смеси (соль в таких концентрациях противопоказана обычным формам жизни), так этот микроб еще к тому же и термофил, то есть любитель тепла. Засоленные озера в пустынях, выжженных тропическим зноем, — вот естественная среда обитания бактерий, содержащих бактериородопсин. Так стоит ли удивляться, что этот белок — одно из самых стабильных веществ белковой природы?

Одного не выносит бактериородопсин — удаления липида. Лишенный липидного компонента, бактериородопсин обратимо денатурирует — свойство, простительное мембранному белку, всегда окруженному жироподобными веществами мембраны. Но и здесь, в этом своем единственном требовании, бактериородопсин совсем не привередлив: можно заменить природный фосфолипид фиолетовых пятен любым другим, и бактериородопсиновый генератор будет работать как ни в чем не бывало.

Итак, бактериородопсин — самый простой и удобный для исследования биологический преобразователь энер-

гии. Давайте же посмотрим, как он устроен. Может быть, хоть здесь мы отдохнем от множества неизвестных, сопутствовавших нам, когда мы вели речь об АТФ-синтетазе и других уже рассмотренных в этой книге генераторах протонного тока.

Но не спешите и не обольщайтесь до срока, читатель. Слов нет, бактериородопсин прост. Он состоит из ретиная и полипептидной цепи умеренной длины. Белковая часть бактериородопсина построена из 248 аминокислотных остатков, образующих линейную последовательность. 19 типов различных аминокислот набраны в строго определенном, уникальном порядке, характерном только для бактериородопсина. Полученная таким образом цепь уложена неким, опять-таки единственным в своем роде способом в мембране бактерии.

Чтобы точно ответить на вопрос, как устроен бактериородопсин, мы должны знать пространственные координаты всех составляющих его атомов (а их около 4 тысяч!). Эта сложнейшая задача уже решена для ряда белков.

Работа такого рода складывается из нескольких этапов. Прежде всего определяют последовательность аминокислот в полипептидной цепи белка, отщепляя одну за другой составляющие цепь аминокислоты (для бактериородопсина с его 248 аминокислотами надо было бы произвести 247 таких операций).

Следующая проблема — как упакована полипептидная цепь? Она никогда не бывает вытянутой в нитку. Цепь образует петли, клубки, закручивается в спираль. Эту трехмерную пространственную организацию белковой молекулы исследуют путем рентгеноструктурного анализа. Кристаллы белка облучают пучком рентгеновских лучей и по отклонению рентгеновских лучей вблизи ядра того или иного атома определяют, в каком месте кристалла он расположен. Затем полученные результаты сопоставляют с данными по аминокислотной последовательности и строят модель молекулы белка.

Бактериородопсину суждено было стать первым мембранным белком, чью структуру удалось выяснить хотя бы в общих чертах. На этом пути пришлось преодолеть немалые трудности, поскольку все предшествующие исследования велись на водорастворимых белках, и именно

для таких белков были разработаны методы определения аминокислотной последовательности и рентгеноструктурного анализа.

Чтобы расшифровать последовательность аминокислот в белке такого размера, как бактериородопсин, исходную полипептидную цепь расщепляют каким-либо способом в нескольких местах на куски и анализируют каждый из полученных фрагментов. Затем вновь обращаются к исходной цепи и расщепляют ее на куски, но уже другим способом. Вновь анализируют фрагменты цепи.

В такой работе вся надежда на то, что при первом и втором расщеплениях места разрывов цепи окажутся различными. Тогда место разрыва при первом расщеплении может оказаться в середине фрагмента, полученного при втором расщеплении, что позволит мысленно состыковать фрагменты и получить полную картину аминокислотной последовательности исходной цепи.

Два обстоятельства осложнили на первых порах работу, когда академик Ю. Овчинников и его коллеги взялись за расшифровку структуры бактериородопсина. Во-первых, белок, спрятанный в мембрану, очень устойчив к действию обычных протеолитических ферментов, применяемых для фрагментации полипептидных цепей. (Здесь стабильность бактериородопсина, пожалуй, в первый и последний раз обернулась против его исследователей.) Во-вторых, полученные в конце концов фрагменты прочно склеивались между собой (белок-то необычный — «жирный»: ведь место его прописки в клетке — гидрофобная мембрана).

Преодолев эти затруднения, химики оказались перед еще более сложной задачей: весьма протяженные участки цепи составлены, как выяснилось, из сходных или даже одинаковых гидрофобных аминокислот. Для дальнейшего анализа таких участков обычные методы не годились.

Исследование структуры белка — трудное и нескорое дело, особенно если речь идет о необычном объекте вроде бактериородопсина. Работу ведут в течение многих месяцев, а иногда и лет, и нет уверенности, что даже в случае удачи вам достанутся лавры первооткрывателя. Более счастливый конкурент может «обскакать» вас на самом финише работы и первым обнародовать аминокислотную последовательность. Тогда ваши результаты вряд

ли примет к публикации серьезный научный журнал и долгий труд окажется напрасным.

Можно, конечно, публиковать аминокислотную последовательность белка по частям, по мере того как завершается расшифровка какого-нибудь крупного фрагмента белковой молекулы. Но и это далеко не безопасный путь, если вас волнует проблема приоритета, так как подобная публикация поможет вашему конкуренту, который уже расшифровал другие звенья цепи.

И тем не менее Ю. Овчинников пошел на публикацию частичной структуры бактериородопсина. Она появилась в одном из летних номеров «Записок Федерации европейских биохимических обществ» (ФЕБС Леттерз) за 1978 год. Ученый знал, что аналогичную работу ведет группа в Сент-Луисе, но, судя по поступающим оттуда сведениям, американцы явно отстали и уже не имели реальных шансов на успех.

Осенью 1978 года работа в Москве была закончена. Полная структура бактериородопсина опубликована в ноябрьском номере «Биоорганической химии» за 1978 год. А в январском номере «Трудов Академии наук США» за 1979 год появилось сообщение о частичной структуре бактериородопсина за подписью одного из самых знаменитых биохимиков нашего времени, индуса Г. Кораны, работающего в Америке. В свое время Корана был первым, кому удалось искусственно синтезировать ген, за что и получил Нобелевскую премию.

Мы давно знали, что Корана в какой-то мере изменил своим прежним интересам, увлекшись тайной устройств мембранных белков-генераторов. Но что делал Корана в новой для себя области, оставалось загадкой. Считалось, что он пытается применить свои выдающиеся способности химика-синтетика к проблеме получения меченных особым способом фосфолипидов, которыми можно было бы зондировать мембрану, погружая молекулы-зонды в ее гидрофобную фазу на разную глубину. Именно этому вопросу была посвящена единственная статья Кораны по мембранам, появившаяся в 1978 году.

И вот теперь неожиданно оказалось, что работа по фосфолипидам — лишь небольшой и явно второстепенный аспект обширной бактериородопсиновой программы Кораны, в которой изучение белка занимает подобающее ему центральное место. Исследование структуры бактериородопсина Корана вел в полной тайне, без каких-либо

устных или тем более печатных сообщений о промежуточных этапах расшифровки полипептида. Уверовав в свою счастливую звезду, он рассчитывал, по-видимому, «выиграть гонку у русских», которые в его предшествующей эпопее с синтезом гена не числились среди серьезных конкурентов.

Но на этот раз великий индус ошибся в своей тактике и проиграл. Вероятно, публикация частичной структуры бактериородопсина была жестом отчаяния, вызванным сообщением, что полная структура этого интереснейшего белка уже опубликована в советском журнале. Может быть также, здесь не обошлось без мысли о том, что статья на русском языке останется не замеченной западной публикой. Но и этот расчет не оправдался. Имя Овчинникова слишком хорошо известно за рубежом, чтобы подписанная им статья не привлекла внимания специалистов. Кроме того, уже весной 1979 года Ю. Овчинников, Н. Абдулаев, А. Киселев, М. Фейгина, Н. Лобанов и И. Назимов опубликовали полную аминокислотную последовательность бактериородопсина по-английски в ФЕБС Леттерз.

Корана все же завершил начатую работу и напечатал свою структуру спустя примерно год после статьи советских авторов в «Биоорганической химии». Данные двух лабораторий практически совпадали на протяжении всей 248-членной цепи. Лишь в нескольких местах обнаружались единичные различия, связанные, по-видимому, с тем, что советские и американские биохимики работали с различными разновидностями бактерий.

Так закончился важнейший этап структурного исследования бактериородопсина: была расшифрована последовательность аминокислот в его полипептидной цепи.

Но какова укладка этой цепи в мембране? На этот вопрос мог бы дать ответ рентгеноструктурный анализ кристаллов бактериородопсина. Однако получение кристаллов мембранного белка, совершенно нерастворимого в воде, — это пока что нерешенная задача. (Лишь в самое последнее время Д. Остерхельт сообщил о кристаллизации бактериородопсина, но еще не ясно, будут ли такие кристаллы пригодны для анализа.)

Правда, в мембране бактериородопсин существует в кристаллическом состоянии. Но это двумерный плоский кристалл. Толщина образца (около 50 ангстрем) здесь слишком мала, чтобы стало возможным применение

классического рентгеноструктурного анализа. И тем не менее именно изучение природных двумерных кристаллов бактериородопсина позволило получить сведения о его пространственной структуре.

Р. Хендерсон в Кембридже, комбинируя электронную микроскопию с математическим анализом, определил трехмерную структуру бактериородопсина в фиолетовых бляшках — фрагментах бактериальной мембраны, содержащих этот белок. Выяснилось, что полипептидная цепь бактериородопсина семь раз пересекает мембрану. Она образует семь спиральных участков, причем длина каждого из них равна толщине мембраны. Каждый из таких участков формирует колонну, укрепленную перпендикулярно плоскости мембраны и пронизывающую всю ее толщу.

Хендерсон описал структуру бактериородопсина с точностью до 7 ангстрем. Этого недостаточно, чтобы определить пространственные координаты отдельных атомов. Однако общий контур молекулы и расположение отдельных ее частей уже могли быть описаны вполне надежно. И вновь, как и при расшифровке аминокислотной последовательности, бактериородопсин оказался первым мембранным белком, трехмерная структура которого была в общих чертах выяснена.

Сопоставив данные по трехмерной структуре и последовательности аминокислот, Овчинников предложил модель бактериородопсина, где полипептидная цепь образует семь спиральных колонн, причем можно определить примерное расположение каждой из 248 аминокислот этой цепи в пространстве. Такой анализ позволил, в частности, локализовать остаток ретиналя — окрашенную группировку, поглощающую свет. Выяснилось, что ретиналь прикреплен к аминокислоте лизина — аминокислоты, расположенной на 216-м месте, считая от одного из концов полипептидной цепи. 216-й лизин находится в глубине мембраны, точнее, в седьмой спиральной колонне на расстоянии примерно $\frac{1}{5}$ пути от наружной поверхности мембраны к ее внутренней стороне.

Таковы сведения о строении молекулы бактериородопсина. Как видно, уровень наших знаний хотя и не достиг здесь еще атомного разрешения, но уже достаточен для того, чтобы приступить к созданию «рабочего чертежа» этого генератора тока.

Как же он работает?

Чтобы точно ответить на такой вопрос, нужно было бы проследить путь протона, переносимого бактериородопсином через мембрану за счет энергии поглощенного кванта света. Что известно по этому поводу?

Свет, поглощенный ретиналем бактериородопсина, вызывает изомеризацию ретиналя: в молекуле ретиналя появляется излом, которого до этого не было. Изомеризация сопровождается отщеплением протона от альдиминной группы в месте прикрепления ретиналя к белку. Затем самопроизвольно, без участия света происходит обратная изомеризация ретиналя и присоединение протона к альдимину.

«Минимальная» гипотеза о механизме работы бактериородопсина исходит из того, что протон, который отщепился под действием света от альдимина, переносится к наружной поверхности мембраны бактерии и выделяется во внешнюю среду. А вот протон, присоединяющийся к альдимину после обратной изомеризации ретиналя, поступает уже с противоположной стороны мембраны, то есть из воды, заключенной внутри бактериальной клетки. В результате оказывается, что один квант света вызывает перенос одного протона из бактерии во внешнюю среду.

Такова гипотеза, но как ее проверить? Ведь речь идет о переносе одного-единственного протона внутри сложной белковой молекулы, масса которой почти в 30 тысяч раз больше массы протона!

К счастью, оказалось, что отщепление протона от альдимина сопровождается обесцвечиванием бактериородопсина. По обесцвечиванию можно судить о том, когда начался процесс транспорта протона и сколько времени протон «находится в пути». Измерения с помощью быстродействующего спектрофотометра показали, что протон стартует через несколько микросекунд после поглощения бактериородопсином светового кванта, а общее время в пути — около десяти миллисекунд.

Час от часу не легче! Сначала мы обнаружили, что нам надо уследить за частицей в 30 тысяч раз более мелкой, чем ее носитель, а теперь выясняется, что время перемещения этой частицы измеряется тысячными или даже миллионными долями секунды. За это время протон проходит путь, равный 50 ангстремам, или 0,000000005 метра.

Невелика дистанция!..

А ведь нужно засечь местонахождение протона на промежуточных этапах его перемещения в белковой молекуле, если мы хотим начертить его траекторию и понять, почему он движется так, а не иначе. Значит, интересующие нас отрезки времени и расстояния в действительности еще меньше.

В решении этой на первый взгляд неподъемной проблемы помог метод, который уже однажды выручил нас, когда мы пытались наладить прямое измерение генерации электрического тока и напряжения мембранными белками.

Помните, как удалось зарегистрировать образование разности потенциалов бактериородопсином? Протеолипосомы, содержащие в своей мембране бактериородопсин, прикрепили к плоской искусственной мембране, по обе стороны которой были электроды. Освещение вызывало транспорт ионов H^+ через мембрану протеолипосом, что регистрировалось подключенным к электродам вольтметром как уменьшение количества положительных зарядов в том отсеке, куда обращена покрытая протеолипосомами сторона плоской мембраны.

Современная электрометрическая техника достигла таких вершин, что уже можно измерять генерацию разности потенциалов со скоростью 10^{-7} — 10^{-8} секунды. Это гораздо быстрее, чем время, затрачиваемое молекулой бактериородопсина на перенос одного протона через мембрану. Стало быть, само по себе измерение перемещений протона в мембране не встречает принципиальных трудностей. Но как это сделать практически?

Протеолипосомы, покрывающие поверхность плоской мембраны на отверстии радиусом около 1 миллиметра, содержат в общей сложности порядка миллиона молекул бактериородопсина. Проблема состоит в том, чтобы синхронизировать работу всех этих фотогенераторов, каждый из которых работает сам по себе. Оказалось, что в принципе и это можно сделать. Существуют лазеры, генерирующие световую вспышку продолжительностью менее 10^{-7} секунды. Если осветить молекулы бактериородопсина такой вспышкой, то все они сработают практически одновременно и только один раз.

Итак, предельно быстрые скорости измерения разности потенциалов и предельно короткие вспышки света — вот что необходимо, если мы собираемся следить за

судьбой протона, переносимого бактериородопсином. К этому надо добавить предельно высокую чувствительность измерительной аппаратуры, чтобы уловить изменение электрических параметров бактериородопсина при небольших смещениях протона внутри его молекулы.

Работать на пределе технических возможностей можно лишь при условии, что исследуемый объект сам по себе стабилен и выдает некий повторяющийся от опыта к опыту результат.

Казалось бы, бактериородопсин должен лучше, чем что бы то ни было, подходить для такой работы (вспомним чрезвычайную устойчивость этого белка к всевозможным изменениям условий среды). Споры нет, сам по себе бактериородопсин стабилен, да вот плоская мембрана, на которую нужно сорбировать протеолипосомы с этим белком, не слишком прочна. К тому же ее прочность уменьшается после присоединения протеолипосом. Как выйти из этого нового затруднения?

Чтобы ответить на поставленный вопрос, придется подумать о причине нестойкости плоской искусственной мембраны, сделанной из фосфолипидов. Причина эта кроется, по-видимому, в огромной диспропорции между толщиной и протяженностью мембраны. По существу, жидкокристаллическая мембрана, имеющая в поперечнике около $5 \cdot 10^{-9}$ метра, закрывает отверстие диаметром около $2 \cdot 10^{-3}$ метра. В привычных для повседневной жизни масштабах это все равно что пленкой толщиной 2,5 миллиметра перекрыть морской пролив глубиной и шириной в 1 километр.

Столь тонкие искусственные мембраны — излюбленный объект исследований по моделированию свойств природных мембран, имеющих ту же толщину. Однако так ли необходимо работать с тонкой мембраной в нашем случае? Ведь у нас она просто сорбент для протеолипосом. Если уж мы решили следить за движением протона в молекуле бактериородопсина, то в общем-то безразлично, на чем сидит бактериородопсиновая протеолипосома — на тонкой мембране или какой-то другой подложке.

И мы отказались от тонких («черных») мембран, использованных в первых наших опытах с протеолипосомами. Вместо них взяли коллодиевую пленку, пропитанную раствором фосфолипидов в углеводороде декане. Это позволило не только стабилизировать систему,

но и увеличить в 10 раз диаметр отверстия между двумя отсеками, куда помещены электроды.

В результате количество бактериородопсиновых протеолипосом, сорбированных на поверхности фильтра, было в 100 раз больше, чем в случае тонкой мембраны. Фотоэлектрический эффект системы, пропорциональный содержанию бактериородопсина, также должен был увеличиться на два порядка. Если бы даже в этом случае эффект оказался все еще слишком мал, чтобы быть зарегистрированным вольтметром, то есть меньше уровня шумов измерительной аппаратуры, мы могли бы вытянуть его из-под этих шумов, многократно повторяя вспышку лазера и используя ЭВМ для отделения эффекта от шумов.

Подключив ЭВМ, мы завершили наконец сооружение установки, с помощью которой можно было бы, в принципе говоря, приступить к изучению белка — генератора тока. По мере монтажа установки небольшая пластмассовая ячейка, разделенная на два отсека перегородкой с отверстием посередине (та, что служила нам верой и правдой в первых опытах с бактериородопсином), обросла таким количеством сложнейших устройств, что нужен был Л. Драчев в качестве специального гида, чтобы объяснить, где же у этого агрегата начало, а где конец.

Неодимовый лазер, система зеркал, ячейка с коллодиевой пленкой и протеолипосомами, каскад быстродействующих усилителей электрических сигналов, блок памяти, ЭВМ и особая система, синхронизирующая работу оптической и электрической систем с точностью до сотых долей микросекунды. Как разительно отличается эта установка от аппаратуры первых опытов биоэнергетиков, где, кроме манометра и примитивного колориметра, никаких других приборов не требовалось! Отсчет времени тогда шел в минутах, а за процессом следили по убыли кислорода и фосфата, если измерялось окислительное фосфорилирование в митохондриях. О пространственном векторе процесса вообще не было и речи. Точность измерения зависела от того, насколько вам удалось совместить уровень ваших глаз с уровнем жидкости в манометре.

Теперь вместо сложно устроенных митохондрий наш объект — индивидуальный белок, временная шкала — доли микросекунды, а задача — проследить за пере-

движением протона, путешествующего от одной поверхности мембраны к другой по встроенной в эту мембрану белковой молекуле.

Но как сработает вся эта громада аппаратуры? Хватит ли чувствительности вольтметра? Не загрубит ли какая-нибудь паразитная емкость шкалу времени?

Драчев уверен, что все будет в порядке. Его гарантия — залог успеха. Говорят, что у Драчева есть необычайное свойство: в его присутствии любой прибор работает нормально.

И вот наконец долгожданный опыт. Еще вчера А. Каулен приготовил протеолипосомы из бактериородопсина и соевого фосфолипида. Другим фосфолипидом пропитана коллодиевая пленка, закрепленная в отверстии между отсеками с электродами. В один из отсеков три часа назад добавили протеолипосомы. За это время они должны были прилипнуть к поверхности пленки.

Проверяем аппаратуру. Луч осциллографа пробегает наискосок зеленый экран, оставляя за собой светлый немеркнущий след. Это разряжается «темновая» разность потенциалов между электродами, только что опущенными в измерительную ячейку.

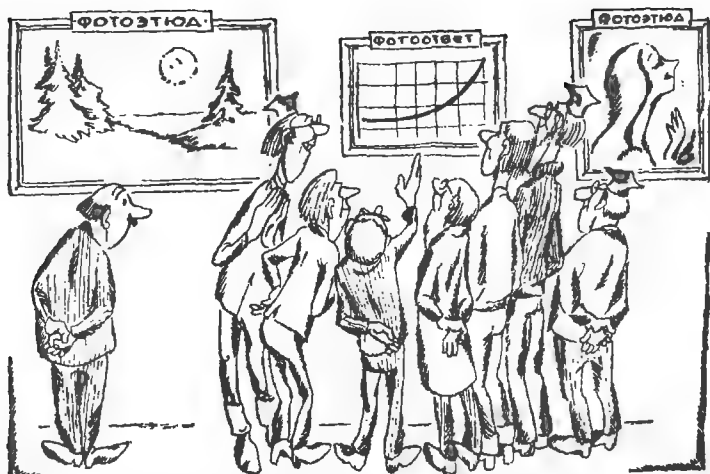
Еще несколько минут ожидания. «Темновая» разность потенциалов исчезла — осциллограф чертит одну за другой горизонтальные прямые, лежащие след в след. Это нулевая линия.

Ну что ж, попробуем для начала повторить наш старый добрый опыт по генерации фотопотенциала при постоянном освещении. Л. Драчев опускает тумблер, чтобы остановить бесконечный бег нулевой.

Нажата кнопка, и отверстие, ведущее к ячейке, освещается постоянным светом мощной лампы. Перевожу взгляд на экран. Здесь записан мощный фотоэффект: между электродами возникла разность потенциалов порядка 200 милливольт. Выключаем свет: кривая отклоняется вниз, неудержимо стремясь к нулевому уровню.

Порядок. Теперь черед за лазером. Какую выбрать измерительную шкалу? Конечно, почувствительней. Ведь бактериородопсин работает всего один-единственный раз.

Вспышка. На какое-то мгновение (мы знаем, на какое — $3 \cdot 10^{-8}$ секунды!) ячейка высвечивается яркой зеленой молнией. Луч осциллографа взметнулся вверх,



зашкалил и вернулся назад, к нулю. Есть ответ, да какой — не хватило шкалы!

Взяли в 10 раз более грубую шкалу, снова вспышка, снова зашкал. Еще в 10 раз заглубили шкалу, и опять недостаточно. Лишь с четвертого раза удалось наконец записать фотоэффект. Он оказался около 60 милливольт.

Да, с таким эффектом работать можно! Но стоило ли гордить всю эту махину? Пока что из всех новшеств потребовался один только лазер.

Эффект хорош, что и говорить! Такого еще не видел никто: генерация потенциала при однократном срабатывании бактериородопсина! Но ведь это не цель, а лишь необходимое условие, чтобы двигаться дальше. Нам надо знать, как переносится протон.

Внимательно рассматриваем кривую нарастания фотопотенциала после вспышки лазера. Нет, эта техника все же чудо! Потенциал нарастал в течение каких-то десяти миллисекунд. Блок памяти запомнил кривую и выдал на осциллограф, который записал ее за две секунды. Мы замедлили время в 200 раз. А потом и вовсе остановили его. Теперь кривая на экране будет светиться до тех пор, пока в этом есть необходимость. Да, кривая красива: на первый взгляд настоящая экспонента. Только в самом начале какая-то излишняя крутизна. Вводим кривую в ЭВМ. Программист А. Драчев просит вычислительную машину измерить временную шкалу

в самом начале кривой. Теперь это будут не милли-, а микросекунды...

Занятна сама процедура общения с этой машиной. Нажав тумблер, мы вводим кривую в память машины. Затем программист печатает на клавишах вроде бы обычной пишущей машинки свою просьбу к ЭВМ. Печатает не какой-нибудь код, а прямо-таки наши обычные, человеческие слова. Этот текст немедленно воспроизводится на экране.

Вскоре на том же экране появляются слова, программистом не напечатанные. Это уже речь самой машины. Она сообщает, что приняла информацию.

Несколько секунд, и на другом экране возникает наша кривая, но теперь уже начало ее дано в микросекундной шкале.

Машина спрашивает, довольны ли мы ее работой. Мы в восхищении, но А. Драчев считает, что великоваты шумы, и просит машину усреднить данные. Еще несколько секунд, и появляется новый вариант нашей кривой — краше прежнего!

А ведь не зря А. Драчев убрал шумы! Теперь видно, что в действительности кривая генерации фотопотенциала состоит из трех фаз. Первая невелика по амплитуде и направлена противоположно основным фазам II и III. Она завершается быстрее, чем может измерить даже наша сверхбыстрая техника (время ее возникновения меньше 10^{-7} секунды). Фаза II заканчивается к сотой микросекунде, а фаза III — к двадцатой миллисекунде после вспышки.

Получив этот результат, мы решили заменить воду в ячейке на D_2O , тяжелую воду, в расчете на то, что это замедлит фазы генерации фотопотенциала, которые связаны с переносом H^+ (известно, что все процессы, где участвует ион водорода, замедляются, если вместо него в среде присутствует ион дейтерия, D^+).

Вспышка лазера, и на экране дисплея ЭВМ яркий зеленый лучик выписывает динамику фотозффекта в D_2O . Фазы II и III явно затянуты. А. Драчев приказывает машине рассчитать время, за которое фаза II достигает 50 процентов своей величины. Это время заметно больше в D_2O , чем в H_2O . То же для фазы III.

Для наглядности программист вызывает из недр памяти ЭВМ кривую прошлого опыта (с обычной водой). На это уходит всего несколько секунд. Лучик рисует дру-

гую кривую, она ложится гораздо левее той, которая была только что получена в опыте с D_2O .

А что с фазой I? К сожалению, ее скорость в D_2O все еще слишком велика и потому ускользает от измерения.

Из опыта с D_2O можно было заключить, что по крайней мере фазы II и III как-то связаны с переносом H^+ .

Независимое подтверждение этого вывода было получено, когда мы сопоставили наши кривые с динамикой спектральных превращений бактериородопсина.

Как показали в свое время У. Стокениус и Д. Остерхельт, поглощение кванта света бактериородопсином ведет к весьма характерному изменению его окраски: сначала спектральный максимум бактериородопсина несколько смещается в красную область, затем происходит резкий сдвиг в противоположную (синюю) область, после чего максимум возвращается в исходное положение.

Так вот времена этих трех спектральных сдвигов оказались весьма сходными с тремя фазами обнаруженного нами фотоэлектрического эффекта: красный сдвиг неизмеримо быстр, синий — десятки микросекунд, возврат к исходному положению — десятки миллисекунд. Мы повторили спектральные измерения Стокениуса и Остерхельта в условиях нашего эксперимента и убедились в хорошей корреляции спектрального и электрического ответов.

Из работ А. Льюса было известно, что синий сдвиг в окраске бактериородопсина обусловлен отщеплением протона от атома азота в альдиминной группе бактериородопсина, а последующий обратный сдвиг — протонированием того же атома.

Теперь сопоставим основные факты, чтобы попытаться представить себе механизм генерации протонного потенциала бактериородопсином. Факты таковы:

1) бактериородопсин переносит протон через мембрану бактерии в направлении изнутри (из цитоплазмы бактериальной клетки) наружу, в омывающий бактерию раствор. Этот процесс сопряжен с поглощением кванта света;

2) свет вызывает изомеризацию ретиналевого остатка, прикрепленного к белковой части бактериородопсина через альдимин, который протонирован в темноте и депротонирован на свету;

3) процесс генерации потенциала при транспорте

протона складывается из трех стадий (фаз), сильно различающихся по своим скоростям;

4) каждой из этих фаз соответствует определенный спектральный переход, причем фаза II коррелирует с депротонированием альдимины, в то время как фаза III — с последующим присоединением к нему протона.

Приняв во внимание все эти наблюдения, можно сформулировать следующую «минимальную» гипотезу.

Свет вызывает такое изменение в окружении протонированного альдимины, что его сродство к протону уменьшается, он отщепляется и затем выделяется в окружающий раствор. После этого окружение альдимины «нормализуется», он переходит в «темновое» положение и вновь приобретает способность связывать протон. Однако теперь уже протон может быть взят только из цитоплазмы бактериальной клетки, но не из внешнего раствора.

Почему же протон, сидящий в темноте на азоте альдимины, выделяется во внешнюю среду, а поглощается из цитоплазмы клетки?

Вероятно, в молекуле бактериородопсина есть два пути, проводящих протоны: один (выходной путь) из глубины мембраны в наружную среду, другой (входной) — из цитоплазмы в глубь мембраны.

В темноте протонированный альдимин находится в конце входного пути. Поглощение светового кванта вызывает изомеризацию ретиналя: остаток ретиналя как бы изламывается, так что прикрепленный к нему на конце атом азота альдимины выходит из контакта с входным путем и перемещается в некое новое положение. Оно в начале выходного пути. Здесь происходит депротонирование альдимины, и выделившийся ион H^+ перемещается наружу.

На следующем этапе происходит обратная изомеризация ретиналя, и альдимин вновь оказывается в конце входного пути, но уже в своей депротонированной форме. Из цитоплазмы по входному пути подтягивается ион H^+ и протонирует альдимин. Цикл завершается.

В рамках этой схемы фаза I фотоэлектрического эффекта есть не что иное, как перемещение протонированного альдимины при изомеризации ретиналя под действием света. Фаза II — перенос протона от альдимины наружу по выходному пути. Фаза III — перенос протона из цитоплазмы к альдимину.

Что требуется для проверки такой гипотезы?

Точное знание, во-первых, местоположения альдимина в темноте и на свету и, во-вторых, устройства входного и выходного путей. Задача это, конечно, сложнейшая, но не безнадежная. Можно даже сказать, что с расшифровкой аминокислотной последовательности и пространственной структуры бактериородопсина наметилась реальная перспектива ее решения. Лишь взяв этот барьер, мы сможем наконец составить чертеж простейшего биологического генератора — бактериородопсина.

РОДОПСИН И ЗРЕНИЕ

Лаборатория погружена во мрак. Лишь в двух углах

большого помещения, заставленного стеллажами с приборами, слабо лучатся красным светом фонари, которые привычнее было бы видеть в комнате фотографа. Привыкнув к темноте, начинаешь различать лица людей, освещаемые зеленоватым мерцающим светом, что струится с экранов осциллографов и дисплеев ЭВМ. Идет опыт на зрительном родопсине.

Да, мы должны были когда-нибудь прийти к этой проблеме. Ведь если столько сил отдано бактериородопсину, то велик соблазн применить ту же аппаратуру к его животному собрату, тем более что с ним связана одна из самых старых и удивительных загадок физиологии.

Животный родопсин был открыт на сто лет раньше бактериального. И тем не менее по сей день мы многого не знаем о его функции. Так не стоит ли сравнить два родопсина, благо функция бактериального белка твердо установлена?

Но что может быть общего у генератора протонного тока в мембране галофильных бактерий и зрительного пурпура в сетчатке глаза?

Два родопсина разделяет дистанция огромного размера. И тем не менее, оказывается, они очень похожи! Вот основные черты этого сходства. Оба белка имеют дело со светом, оба поглощают этот свет ретиналем, привязанным к белку через альдимин. Этот альдимин в обоих случаях протонирован в темноте и депротонируется под действием светового кванта, вызывающего изомеризацию ретиналя. В довершение всего оба — мембранные белки, упакованные таким образом, что два конца полипептидной цепи торчат по разные стороны мембра-

ны. Полипептидные цепи и того и другого родопсинов содержат большое количество спирализованных участков.

Получается, что животный и бактериальный родопсин прямо-таки близнецы! Как же это увязать с тем, что первый участвует в зрении животных, а другой в энергообеспечении бактерий? Конечно, бывает так, что близнецы выбирают себе разные профессии. Однако это может произойти лишь под давлением чрезвычайных обстоятельств жизни, как утверждают специалисты из центра по исследованию близнецов в Миннесоте. Обычно же близнецы посвящают себя сходным сферам деятельности.

Так, может быть, зрительный родопсин — фотоэлектрический генератор наподобие бактериородопсина?

На первый взгляд такая мысль может показаться странной по одной простой причине: зрительный родопсин, поглотив квант, срабатывает только один раз. В отличие от бактериального родопсина он необратимо обесцвечивается под действием света, теряя остаток ретиналя, который выделяется в воду. Регенерация окрашенного родопсина занимает минуты и потому не может идти ни в какое сравнение с бактериородопсиновым циклом, измеряемым миллисекундами. Ясно, что животный родопсин в противоположность бактериальному не в состоянии генерировать устойчивый ток.

И все же какая-то фотоэлектрическая активность присуща и зрительному родопсину. Еще в 1964 году К. Браун и М. Мураками описали очень быстрый двухфазный сдвиг разности потенциалов на мембране фоторецепторной клетки сетчатки при включении света. Первая фаза возникала за время короче микросекунды и могла быть связана только с самым первым участником фоторецепторной системы, то есть с родопсином. Вторая фаза развивалась в миллисекундной шкале. Она была направлена противоположно первой фазе. Физиологи не придали большого значения эффекту (он был назван ранним рецепторным потенциалом, сокращенно РРП) вследствие его малой амплитуды: даже при мощном освещении величина потенциала не превышала двух-трех милливольт.

Интерес к РРП возник вновь, когда было доказано, что функция бактериородопсина состоит в генерации потенциала и тока. В 1977 году М. Монтал сообщил о фо-

тоэффекте при облучении тефлоновой пленки, покрытой животным родопсином. Величина потенциала по-прежнему была невелика.

Одновременно и независимо М. Островский и его коллеги из Института химической физики в Москве попытались применить к животному родопсину наш метод, использованный для регистрации электрического фотответа бактериородопсина. Пористый фильтр пропитывали раствором фосфолипидов, затем, с одной стороны, добавляли фоторецепторные диски — плоские мембранные пузырьки, которыми заполнены клетки палочек сетчатки. Именно в мембране дисков сосредоточена большая часть фонда родопсина палочек. В присутствии ионов кальция диски подклеивались к фильтру, после чего включался свет.

Как показали измерения, в такой системе может быть получен значительный фотоэффект (порядка 20 милливольт). Правда, потенциал быстро падал во времени и через несколько секунд после включения света исчезал вовсе. Но такая динамика в общем-то неудивительна, если учесть, что на свету происходит необратимое обесцвечивание родопсина.

К сожалению, сам по себе факт генерации разности потенциалов под действием поглощаемого белком света еще недостаточен для вывода о том, что функция этого белка сводится к превращению световой энергии в электрическую. Например, американский биофизик Х. Тьен описал фотоэлектрический эффект при облучении ультрафиолетом плоской фосфолипидной мембраны, сорбиравшей химотрипсин — пищеварительный фермент, не имеющий никакого отношения к процессам трансформации энергии света хотя бы потому, что он работает в полной темноте — в кишечнике.

По-видимому, свет вызывал перемещение каких-то заряженных групп в молекуле химотрипсина, что и приводило к генерации потенциала.

Фотоэффекты такого типа возникают в момент включения света и быстро исчезают в процессе освещения, поскольку в системе не происходит истинного переноса зарядов через мембрану и генерации постоянного тока. Неудивительно, что фотоэффект в экспериментах Тьена с химотрипсином был невелик, всего несколько милливольт.

В опытах Островского электрический ответ родопси-



на иа освещение был в несколько раз больше, чем у Тьена. И все же сохранялась опасность артефакта «á la Тьен».

Чтобы разобраться в этом деле, мы решили исследовать динамику образования потенциала зрительным родопсином в тех же условиях, которые были использованы применительно к бактериородопсину.

Опыт занимал два дня. Начинался он в лаборатории М. Островского, куда утром привозили с мясокомбината шестьдесят глаз только что забитых быков. Из глаз препарировали сетчатки, отделяли внешние сегменты клеток-палочек, а из-этих сегментов получали фоторецепторные диски, в мембране которых локализован родопсин. На все это уходил день. Утром следующего дня в нашей лаборатории появлялся энергичный чернобородый человек с чемоданчиком. Его приход мы неизменно приветствовали с энтузиазмом.

— Гриша Каламкаров! С дисками! — кричал в коридоре первый, кто попадался на пути человеку с чемоданчиком.

Приход Каламкарова означал, что опыт состоится. В 434-ю комнату собирались его участники: Л. и А. Драчевы, А. Каулен.

Прежде всего плотно зашторивали окна и зажигали красные лампы. Родопсин боится белого света. Достаточно однажды осветить диски — и весь опыт пропал!

Вот почему работа с животным родопсином внешне напоминает какое-то таинство, совершающееся в красном полумраке. Красный свет не поглощается родопсином и поэтому безопасен для него.

Каулен добавляет суспензию дисков в ячейку, разделенную на два отсека коллодиевой пленкой, предварительно пропитанной раствором фосфолипида в декане. Следуют два часа томительного ожидания: случайно натолкнувшись на коллодиевую пленку, диски прилипают к ней. Надо подождать, пока вся поверхность пленки покроется слоем дисков.

И вот наконец в дверях моего кабинета появляется громоздкая фигура Каулена. Я давно уже жду этого момента, поглядывая на часы: нетерпение перед опытом мешает слушать собеседника, расположившегося напротив меня уютно и, видимо, надолго.

— Владимир Петрович, начинаем, — говорит Каулен вроде бы равнодушно. Но я знаю, что и ему не терпится поскорее приступить к делу.

Что ж, конец беседе! Начинается опыт!

Как-то сложилось, что опыты с животным родопсином стали для всех нас: Драчевых, Каулена, Островского, Қаламкарова — какими-то особенно волнующими.

Это произошло, наверно, потому, что с первого же дня на нас посыпались новые наблюдения, которые немедленно обрабатывались А. Драчевым на ЭВМ, так что почти каждый опыт, по существу, оказывался пусть небольшой, но законченной научной работой. Затем опыт нужно было несколько раз повторить, а там хоть садись и пиши статью.

Но мы тогда не стремились к повторам, статей не писали, а ставили все новые и новые опыты, идея которых возникала из только что полученного результата. Эксперимент вел нас за собой, но куда? Мы верили: к разгадке тайны зрительного родопсина, а значит, и к решению проблемы первичного механизма зрения.

...Урчит на одной ноте вентилятор где-то в чреве лазерной установки. Тайнственно постукивает ЭВМ: А. Драчев и машина ведут между собой диалог глухих. ЭВМ печатает время от времени на экране ответы на вопросы человека и свои вопросы к нему.

Каулен нажимает кнопку — вспышка лазера. Ослепительный зеленый луч метнулся к ячейке с коллодиевой пленкой и дисками. В ту же секунду на экране осцил-

лографа возникла хитрая кривая: очень быстро вниз, потом медленней вверх и совсем медленно дальше вверх.

«Очень быстро» — это быстрее, чем 0,2 микросекунды. «Медленнее» — 500 микросекунд. «Совсем (!) медленно» — 10 миллисекунд.

Так ведь это три фазы фотоэлектрического эффекта бактериородопсина!

Действительно, сходство ответов двух родопсинов необычайное! Только хорошо присмотревшись и посоветовавшись с ЭВМ, мы замечаем деталь, их отличающую: у животного родопсина нарастание потенциала во второй фазе оказывается более медленным, чем у бактериального. А в остальном полное подобие.

Подобными оказались: направление фаз (первая противоположна второй и третьей), соотношение амплитуд этих фаз (амплитуда растет от первой фазы к третьей), общая величина ответа, скорость спада потенциала, направление движения зарядов через мембрану.

Все эти параметры как бы паспорт белка-генератора. Они зависят от устройства генератора. Поэтому у разных белков должны быть разные «паспортные данные». В этом мы смогли убедиться еще до опытов со зрительным родопсином, когда исследовались хлорофилл-белковые комплексы фотосинтезирующих бактерий.

Вот какими показателями характеризовалась хлорофилл-белковая система в условиях, идентичных тем, что мы использовали для родопсинов: выявлялись только две однонаправленные фазы нарастания фотопотенциала, причем первая фаза (быстрее 0,2 микросекунды) была гораздо больше по амплитуде, чем вторая (20 микросекунд). Добавление некоторых искусственных переносчиков электронов вело к появлению еще одной, небольшой по амплитуде фазы, направленной в ту же сторону. В спаде фотопотенциала преобладала компонента со временем около 30 миллисекунд. (У родопсинов — секунда.) Как видно, эти параметры резко отличались от тех, что были обнаружены при исследовании бактериального и животного родопсинов.

Итак, оба родопсина дают фотоэлектрические ответы, характеристики которых либо близки, либо просто совпадают. Поскольку функция бактериородопсина —

превращение энергии света в электрическую форму, напрашивается предположение, что неизвестная функция животного родопсина также состоит в производстве электричества за счет света. Именно такую рабочую гипотезу мы взяли на вооружение, убедившись в сходстве «паспортных данных» двух родопсинов.

У бактерий электричество, генерируемое на свету, используется для синтеза АТФ, транспорта ионов внутрь клетки, вращения бактериальных жгутиков и т. д. Но зачем нужно электричество при зрении?

Пожалуй, самое поразительное свойство зрения состоит в том, что клетка палочки может возбуждаться одним-единственным квантом света. Ясно, что столь малая порция энергии может привести в действие механизм возбуждения только при условии размножения команды, поданной светом.

Есть несколько конкурирующих гипотез о способе размножения светового сигнала. Мы остановились на одной из них, так называемой кальциевой. В фоторецепторных дисках, заключенных внутри клетки палочки, накапливаются ионы кальция (вероятно, за счет энергии АТФ). При поглощении кванта света молекулой родопсина, встроенной в мембрану диска, происходит повышение проводимости этой мембраны для ионов, в частности для кальция. Ионы кальция выходят из диска, где их много, в омывающую диск цитоплазму, где их мало. Свет как бы дырявит диск, и этот мешок с кальцием начинает «протекать».

Поскольку в диске много ионов кальция, и все они могут «вытечь» через одну-единственную дырку, сделанную квантом света, происходит «размножение» сигнала: *один* квант вызывает выход в цитоплазму *многих* ионов кальция.

Следующее предположение состоит в том, что вышедший кальций достигает внешней мембраны клетки и закрывает имеющиеся в ней натриевые каналы. Катион Na^+ перестает поступать в клетку, что повышает электроотрицательность внутриклеточного содержимого относительно межклеточной среды. Такое повышение мембранного потенциала (минус внутри клетки) и есть возбуждение. Весть об этом событии будет затем передана на окончания зрительного нерва и далее по нерву в мозг.

Отдельные моменты этой схемы доказаны. Так, из-

вестно, что ионы кальция, накопленные в дисках в темноте, выходят оттуда под действием света; что кальций, введенный в клетку, закрывает натриевые каналы, вызывает гиперполяризацию клеточной мембраны и возбуждение; что без кальция возбуждение невозможно и т. д.

Совершенно неясным оставался лишь первый этап всей этой длинной цепи событий: почему поглощение кванта света приводит к повышению проницаемости мембраны диска и достаточно ли быстро это происходит (весь зрительный акт от поглощения кванта до возбуждения зрительного центра в мозгу занимает порядка 100 миллисекунд, и потому любые процессы, включенные в передачу сигнала, должны протекать за время меньшее, чем 100 миллисекунд)?

Неожиданно для себя мы прежде всего получили ответ на второй из поставленных вопросов: быстро ли повышается проводимость мембраны под действием света.

Наши предшественники М. Монтал, У. Хейгенс (автор «кальциевой» гипотезы зрения) и другие использовали слишком медленные способы измерения. В наших опытах быстрым и чувствительным индикатором проводимости мембраны оказалась скорость спада фотопотенциала после лазерной вспышки. Чем больше проводимость, тем быстрее спадает фотопотенциал, что и неудивительно: «дырявая» мембрана не может удерживать разности потенциалов после выключения генератора.

Опыты показали, что медленнее всего спадает потенциал, полученный при первой вспышке света. Уже вторая вспышка дает более быстрый спад, а к двенадцатой спад фотопотенциала ускоряется примерно в сто раз. И здесь выяснилось, что этот эффект (ускорение спада) развивается за отрезок времени, меньший чем 100 миллисекунд. Стало быть, увеличение проводимости действительно может участвовать в основной цепи событий процесса зрения.

Интересно, что ускорение спада фотопотенциала было обнаружено благодаря ЭВМ. Повторные вспышки сильно снижают амплитуду фотопотенциала (с каждой следующей вспышкой все большая доля родопсина оказывается обесцвеченной, то есть выведенной из игры). Мы могли бы и не заметить ускорение спада на фоне резкого снижения амплитуды самого эффекта, тем бо-

лее что первоначально об анализе динамики спада никто не думал: все внимание было сосредоточено на самом эффекте генерации потенциала.

А. Драчев, пробуя всевозможные варианты обсчета фотоэффекта, как-то раз попросил машину нормировать электрические ответы родопсина по их амплитуде. И немедленно обнаружилось, что с каждой последующей вспышкой ускоряется спад потенциала.

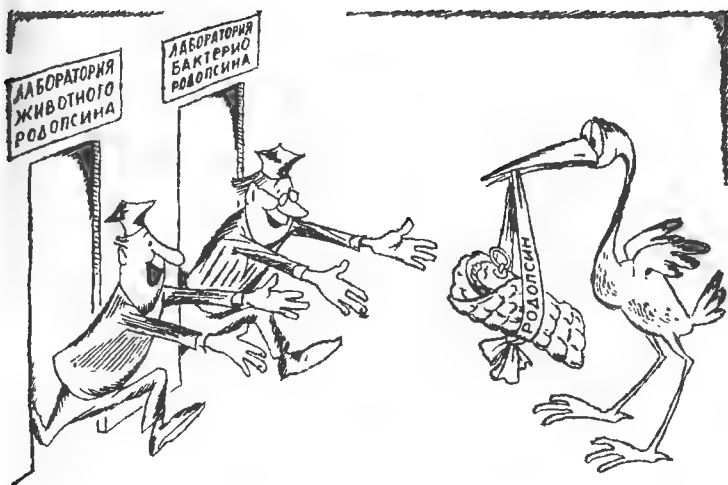
Итак, налицо было два новых факта: однократное срабатывание родопсина приводит, во-первых, к генерации разности потенциалов на мембране дисков и, во-вторых, к очень быстрому повышению проницаемости той же мембраны.

Второй из этих эффектов не что иное, как нарушение барьера, удерживающего ионы кальция внутри диска. Освобождение кальция из диска в цитоплазму — это согласно «кальциевой» гипотезе один из этапов зрительного акта. Но почему повышается проницаемость и в чем смысл первого эффекта — генерации разности потенциалов?

А что, если первый эффект — причина, а второй — следствие? Ведь известны случаи, когда разность потенциалов на мембране управляет ее проницаемостью, открывая ионные каналы. Именно так действуют электровозбудимые мембраны (например, мембрана нервного волокна — аксона). Существует и другой тип мембран — химически возбудимые, когда ионные каналы открываются под действием особых химических соединений — медиаторов. Примером такого рода может быть мембрана нервного окончания.

Так, может быть, мембрана диска относится к классу электровозбудимых? Тогда загадочная функция животного родопсина ничем не отличается от известной уже функции бактериородопсина: это производство электричества за счет света. Отличие двух систем будет лишь в дальнейшей судьбе полученного родопсином электричества. У бактерий созданная за счет света разность потенциалов идет на синтез АТФ и обеспечение других видов работы клетки, а в фоторецепторных дисках она, эта разность потенциалов, открывает в мембране какие-то ворота, через которые затем выходят из диска ионы кальция.

Неужто мы свели концы с концами? Да, теперь, по-



видимому, мы можем разъяснить все основные обстоятельства дела.

Понятно, почему так похожи два родопсина: ведь функция у них общая! Или почему кальций на свету выходит из дисков: поле, образованное родопсином, прорубает в мембране дорогу этому иону. Ясно также, в чем причина неудач наших предшественников: пока оставались неизвестными «паспортные данные» родопсиновых генераторов, не было оснований приписывать зрительному родопсину ту функцию, которая выяснена для родопсина бактериального.

Но ведь ранний рецепторный потенциал клеток сетчатки (РРП) был обнаружен еще до открытия бактериородопсина, причем имелись основания приписать этот РРП родопсину. Так почему же физиологи не решились отнести фоторецепторную мембрану к разряду электровозбудимых?

Сегодня мы можем ответить и на такой вопрос. Загвоздка была в малой величине фотопотенциала. РРП даже при сильном освещении не превышал нескольких милливольт. А ведь для возбуждения достаточно одного кванта света. Расчет показывает, что даже если мы переведем всю энергию этого кванта в электричество, то разность потенциалов на мембране диска не превысит 10 микровольт, считая, что она делокализуется по

всему диску. Это мизерная величина, если требуется совершить что-нибудь полезное.

Но кто сказал, что родопсиновый потенциал сначала делокализуется, расползается по всему диску, а потом уж работает? Почему бы не работать локальному полю, возникающему в той точке мембраны, где родопсин перенес через мембрану заряд?

Тот же расчет для локального поля дает огромную величину — около 2 вольт. Даже если принять КПД родопсинового генератора всего за 10 процентов, то локальное поле будет около 200 милливольт. Такая разность потенциалов более чем достаточна, чтобы открыть кальциевый канал, особенно если он заключен в самой молекуле родопсина.

Единственное условие для механизма, использующего локальное поле, — это быстроедействие: надо успеть сработать, пока поле еще не растеклось по диску. Как достичь максимального быстрогодействия? Надо иметь наготове какое-то не слишком сложное устройство, отвечающее нужным образом на появление поля.

Что проще: создать специфический канал или сломать барьер? Конечно, второе. Ломать — не строить.

Наша гипотеза состоит в том, что поле, генерируемое молекулой родопсина, вызывает электрический пробой в том самом месте мембраны, где располагается эта молекула. Пробой означает повышение проницаемости мембраны. Именно этот эффект и приводит к истечению ионов кальция из диска.

Любопытно, как природа жертвует второстепенными моментами ради решения главной задачи. Фоторецепция — одна из самых чувствительных и быстрых систем организма. Она отвечает на столь слабое воздействие, как поглощение одиночного кванта света, причем первичный ответ на свет развивается в рекордно короткие сроки. И этим двум ведущим характеристикам: чувствительности и быстромудействию — принесены в жертву другие параметры механизма, которые оказываются менее совершенными по сравнению с прочими устройствами такого типа.

Так, проводимость мембраны, возникающая на свету, не избирательна к ионам кальция, что и понятно, если речь идет о таком грубом повреждении мембранного барьера, как электрический пробой. В то же время ионные каналы обычных возбудимых мембран селек-

тивны, то есть весьма разборчивы к типу иона, движущегося через мембрану. Для фоторецепторного диска такая неразборчивость не страшна, поскольку кальций — единственный тип ионов, накапливающихся внутри диска.

Еще один пример того же рода. Сработав один раз, животный родопсин теряет хромофор — ретиналь и тем самым временно выходит из строя. Для последующей регенерации дееспособного родопсина требуется специальная ферментная система. Вспомним для сравнения бактериородопсин, в котором обратная изомеризация ретиналя происходит самопроизвольно, так что дело никогда не доходит до потери белком его хромофора.

И вновь, как и в случае с ионной селективностью, это несовершенство оказывается несущественным для выполнения зрительным родопсином его основной функции. Вероятность попадания второго кванта света на ту же самую молекулу родопсина столь мала, что сложный механизм регенерации активного родопсина в общем-то не должен существенно затруднять работу фоторецепторной клетки в естественных условиях нашей жизни.

Единственное ограничение — не следует долго смотреть прямо на солнце, иначе родопсин обесцветится и наступит минутная потеря зрения. Но спрашивается, какой резон подолгу рассматривать в упор наше светило и велика ли беда, если родопсин для этого не приспособлен?

Да, все как будто складывается в пользу гипотезы о том, что бактериальный и животный родопсин различаются лишь по второстепенным моментам и сходны в главном, играя в принципе одну и ту же роль фотозлектрических преобразователей энергии.

«Для экспериментатора... гораздо выгоднее работать с плохими гипотезами, чем вовсе без гипотез, когда неизвестно, что надо проверять», — писал наш известный биолог Н. Кольцов.

Если гипотеза помогла нам на деле, мы благодарны ей. Но не следует допускать, чтобы чувство благодарности, в общем-то вполне оправданное, переросло в слепую привязанность.

Здесь можно вспомнить старинную индусскую сказку, которую воскресил для нас Э. Ракер в своей статье

об истории биоэнергетики. Как-то раз на человека напал лев. Спасаясь от него, человек бросился к реке и прыгнул в лодку, случайно оказавшуюся у берега. Потом он был так благодарен этой лодке, что таскал ее на спине всю остальную жизнь.

Гипотеза работает, если сбываются ее предсказания. Пока «электрическая» модель родопсина себя оправдывает. Что будет дальше?..

— Владимир Петрович, начинаем! — флегматично бросает Каулен, заглянув в мой кабинет.

Пора! Мы ставим сегодня следующий опыт...

ЭЛЕКТРОДВИГАТЕЛЬ, ИЗОБРЕТЕННЫЙ БАКТЕРИЕЙ

ФЛАГЕЛЛА, КРЮК И ДИСКИ

Многие бактерии подвижны. Под световым микроскопом видно, что они активно перемещаются в пространстве: плывут со скоростью несколько микрон в секунду. Если использовать электронный микроскоп, то при максимальном увеличении можно разглядеть устройство двигательного аппарата бактерии.

Его наиболее крупная часть — это флагелла, или жгутик, — длинный тяж, состоящий из однотипных молекул флагеллина — особого, не растворимого в воде белка. Флагелла достигает несколько микрон в длину, то есть она длиннее тельца бактерии. Это как бы хвост микроба. Толщина флагеллы порядка 130 ангстрем.

Флагелла крепится к изогнутому на конце стержню («крюку»), который проходит сквозь внешнюю мембрану бактериальной клетки. Крюк, в свою очередь, прикреплен к М-диску, правильной формы структуре (в плане — круг, в разрезе — прямоугольник). Диаметр диска чуть больше 200 ангстрем, толщина около 30 ангстрем. М-диск погружен во внутреннюю (цитоплазматическую) мембрану бактерии.

В межмембранном пространстве и в слоях клеточной стенки, расположенных снаружи цитоплазматической мембраны, находят еще три диска, укрепленных на стержне крюка. Стержень ориентирован перпендикулярно плоскости дисков и мембран.

Наблюдая в световой микроскоп движение кишечной палочки, обладающей многими жгутиками, можно заметить, что от одного из торцов цилиндрической клетки отходит вращающаяся спираль, ввинчивающаяся в воду. Это косичка из нескольких жгутиков, движение которых обуславливает движение бактерии.

Как же движутся жгутики? Вращаются или бьются о воду как хлысты? Чтобы ответить на этот вопрос, пришлось... поймать бактерию за «хвост». Да-да, ни больше ни меньше!

Суспензию бактерии, содержащую миллионы отдельных клеток в миллилитре, поместили в стакан миксера

с металлическим пропеллером на дне. Включили миксер на некоторое время и затем посмотрели, что произошло с бактериями. Большинство из них осталось целыми, но лишилось «хвостов», которые лежали теперь отдельно от своих хозяев.

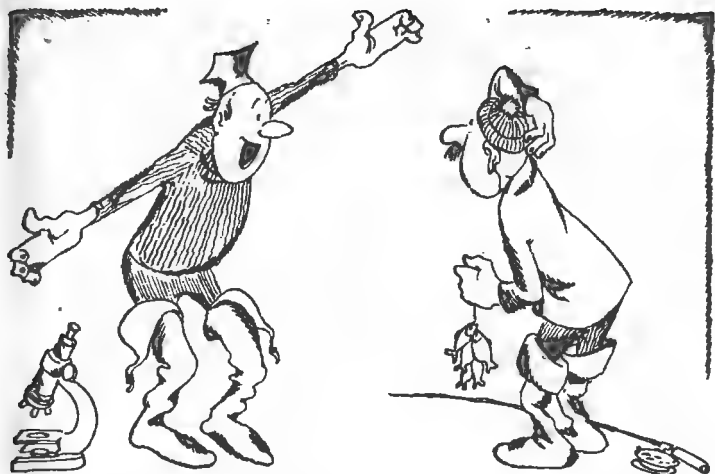
На следующем этапе работы жгутики выделили в чистом виде с помощью центрифугирования, а затем ввели в кровь кролику. Иммунная система кролика ответила на вторжение чужеродного компонента синтезом антител к флагеллину — белку жгутиков. Потом такие антитела получили из крови и химически «пришили» к стеклу.

Антитела, как известно, способны прочно связывать тот белок, против которого они были образованы. Этим-то свойством и воспользовались исследователи. На предметное стекло, покрытое антителами, нанесли капельки жидкости с бактериями и стали терпеливо ждать, пока какой-нибудь «невезучий» микроб коснется своим жгутиком поверхности стекла.

Вот одна из бактерий приблизилась к стеклу, но внезапно изменила направление движения и поплыла в другую сторону. Вот другая появилась в опасной зоне. И снова в последний момент ушла от опасности. Третья атаковала стекло в лоб, немедленно изменила направление движения и поймалась! Видно было, что бактерия вращается на одном месте, привязанная к стеклу невидимой нитью.

А. Глаголеву, проделавшему похожий опыт в нашей лаборатории, удалось «поймать» асимметричную по форме бактерию, напоминавшую своим видом полумесяц. Прикрепилась она к стеклу так, что к наблюдателю была обращена ее сутулая «спина». Видно было, что бактерия все время вращается вверх «спиной», не показывая своей впалой «груди». Это возможно только при условии, что происходит истинное вращение тельца бактерии относительно прикрепленного к стеклу жгутика.

Поразительно, как пойманная бактерия решила проблему освобождения из плена. Бактерия не ящерица, она не умеет отбрасывать попавший в ловушку хвост. Она выбрала иной путь к спасению. Через 40 минут безуспешных попыток вырваться на волю наша бактерия... разделилась пополам. Из двух новых клеток одна оста-



лась привязанной к стеклу, а другая освободилась и тотчас уплыла подальше от опасной зоны.

Вернемся, однако, к устройству двигателя, изобретенного бактериями, благо здесь нас ждут свои чудеса.

Итак, опыт с «привязанной» бактерией однозначно доказал, что происходит вращение жгутика. Но что за сила заставляет его вращаться?

Отвлечемся на момент от бактерий и обратимся к более высокоорганизованным формам живых существ, также движущихся с помощью жгутиков. Вот, например, сперматозоид. Источник энергии, используемый его двигательным аппаратом, давно уже не составляет секрета. Это АТФ, гидролизующийся сократительным белком — АТФазой, близким по свойствам к тому, который содержится в мышцах и тоже использует энергию АТФ для совершения механической работы.

Распад АТФ приводит в движение жгутик сперматозоида. Так, может быть, и жгутик бактерии вращается за счет энергии АТФ?

Стали искать сократительные белки — АТФазы у бактерий и в конце концов нашли. Правда, флагеллин, белок бактериального жгутика, не относится к их числу. Все попытки принудить флагеллин к гидролизу АТФ окончились полной неудачей. Но может быть, АТФаза сидит где-то в других частях «мотора», например в дисках? Однако и это предположение пока не подтвердилось.

А стоит ли вообще проводить какие-то аналогии между флагеллами бактерий и жгутиками высших? Ведь бактериальная флагелла гораздо мельче, да и устроена она несравненно проще: это тяж из структурного белка флагеллина, не обладающего какой-либо каталитической активностью. Жгутик сперматозоида гораздо более сложное образование: внутри мембранного чехла одиннадцать трубочек, вытянутых вдоль длинной оси жгутика, есть там сократительные белки и целое хозяйство ферментов.

Ну что ж, давайте откажемся от гипотезы относительно общности механизмов движения бактерии и сперматозоида, но не рискуем ли мы в этом случае вовсе остаться без гипотезы? Ведь все известные до сего времени механизмы биологической подвижности основывались на использовании энергии АТФ сократительными белками.

ПРОТОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ДВИЖЕТ БАКТЕРИЕЙ

В 1956 году, то есть за пять лет до публикации своей знаменитой гипотезы, Митчел напечатал заметку о возможных механизмах движения флагеллярных бактерий. Один из них мы опустим за ненадобностью (он казался фантастичным и оказался таковым). Но вот другой Митчелов вариант лег в основу нашей рабочей гипотезы спустя «каких-то» 18 лет.

Митчел обратил внимание на то, что «кирпичи» флагеллина в бактериальном жгутике уложены таким образом, что в поперечном сечении жгутик имеет вид толсто-стенной полый трубки. Что, если, подумал Митчел, эта трубка — гигантский канал, ведущий из бактерии во внешнюю среду? По такому каналу можно было бы, например, выпускать из бактерии ионы K^+ , которые каким-то образом аккумулируются бактерией, поступая внутрь клетки через всю ее поверхность. А может быть, это канал для входа в клетку ионов H^+ (!), откачивающихся через клеточную поверхность? По Митчелу, в любом из этих случаев вдоль наружной поверхности клетки должен возникать ток ионов, который мог бы приводить в движение бактерию.

В 1974 году Дж. Адлер и его сотрудники опубликовали в США работу по движению мутанта кишечной палочки, лишённого способности синтезировать АТФ за счет дыхания. У мутанта включение дыхания никак не

влияло на количество АТФ, который образовывался исключительно за счет брожения. Казалось, дыхание идет на холостом ходу и бесполезно для клетки. К своему удивлению, авторы статьи обнаружили, что это «холостое» дыхание способно поддерживать движение мутантной бактерии.

Они удивились еще больше, когда измерили скорость движения бактерий, обработанных арсенатом. Такая обработка снижала количество АТФ в клетке до практически неизмеримого уровня. И тем не менее лишённые АТФ бактерии отлично двигались, если в среде был кислород и протекал процесс дыхания.

Остановить бактерии удалось, добавив протонатор.

Авторы заключили, что непосредственным источником энергии для движения бактерий служит не АТФ, а какой-то другой компонент, образуемый дыханием. («Промежуточный продукт окислительного фосфорилирования», — писали Адлер и его коллеги, не искушенные в премудростях хемиосмотической гипотезы.)

В то время концепция протонного потенциала была далеко не общепринятой даже в кругу биоэнергетиков. Поэтому вряд ли стоит удивляться, что микробиолог Адлер сформулировал свой вывод в рамках старой схемы, предполагавшей существование каких-то особых химических соединений, образуемых дыханием и потребляемых АТФ-синтетазой.

Однако для меня тогда уже было ясно, что у этих двух систем есть только один общий продукт — протонный потенциал. Стало быть, мутант кишечной палочки, исследованной американскими микробиологами, образовывал за счет дыхания протонный потенциал, который, по-видимому, и служил источником энергии для движения бактериальной клетки. Именно такое толкование опытов Адлера я предложил, выступая летом 1975 года на очередном съезде европейских биохимиков.

В подтверждение своей правоты я привел данные опытов, поставленных А. Глаголевым на пурпурной фотосинтезирующей бактерии. Испытывая различные комбинации ферментных ядов и разобщителей-протонаторов, Глаголев показал, что скорость движения микроба пропорциональна величине протонного потенциала, а не количеству АТФ. Это был важный шаг вперед по двум причинам.

Во-первых, стало ясно, что эффект Адлера не есть

некое исключительное свойство или следствие «уродства», присущее одному только мутанту кишечной палочки. Скорее это характерная черта дыхательного аппарата бактерий вообще, поскольку она проявляется и у мутанта кишечной палочки, и у столь отдаленного в эволюционном отношении вида, как пурпурная бактерия-фотосинтетик, причем нормальный, а не мутантный штамм. Существенно, что в качестве исходного энергетического ресурса для движения эти бактерии в отличие от кишечной палочки использовали свет, а не дыхание.

Во-вторых, Глаголев не в пример Адлеру «знал, где искать»: он мерил не только АТФ и скорость движения, но и мембранный потенциал. Обнаруженная им линейная зависимость между скоростью движения и потенциалом явилась сильным доводом в пользу нашей рабочей гипотезы.

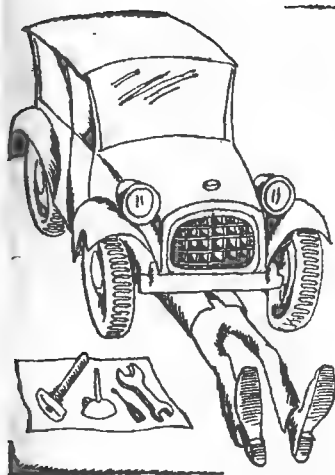
Тем не менее нужен был прямой эксперимент. И он был вскоре поставлен.

Мы рассуждали таким образом. Если свет у нашей бактерии (или дыхание у кишечной палочки) нужен для движения только постольку, поскольку за их счет генерируется протонный потенциал, то можно получить подвижность и в отсутствие света (или дыхания), создав этот потенциал искусственно. Как это сделать?

Прежде всего необходимо перекрыть все пути образования протонного потенциала белками-генераторами. Затем к таким неподвижным уже бактериям надо добавить, например, кислоту, но не столько, чтобы, избави бог, их убить, а небольшое количество, которое просто создало бы некоторую избыточную концентрацию ионов водорода во внешней среде по сравнению с цитоплазмой бактериальной клетки. Поскольку в обычных условиях протонные генераторы бактерий откачивают ионы H^+ из клетки во внешнюю среду, то добавка кислоты должна имитировать включение генераторов.

С нетерпением я ждал результата этого опыта. Исполнится ли удивительное предсказание гипотезы: очнутся ли от паралича бактерии, отравленные целым коктейлем ядов, если в среду просто добавить немного соляной кислоты?

Опыт такого типа называют «острым». Гипотеза, положенная в основу острого опыта, выбирает из множе-



ства один-единственный вариант ответа системы на предполагаемое воздействие. Бактерии неподвижны из-за нехватки энергии. Так почему бы не добавить к ним АТФ — энергетический ресурс *всех* уже известных механизмов биологической подвижности? Или какой-нибудь другой нуклеозидтрифосфат, пирогосфат, фосфоэнолпируват, ацетилфосфат, ацетилкофермент А, то есть вещества, известные своей способностью оплачивать энергозатраты на отправление определенных биологических функций? А если уж менять рН среды, то почему добавлять кислоту, а не щелочь?

Из всех этих возможностей гипотеза «протонного мотора» прямо указывала на одну. «Добавь кислоты, и они задвигаются!» — подсказывала гипотеза Глаголеву, наблюдавшему в микроскоп обездвиженные бактерии. Они беспомощно броунировали в капле ядовитого раствора, как если бы это были не живые существа, а крупинки китайской туши. Рядом, на том же предметном стекле, — капелька кислоты. Глаголев осторожно смешивает две капли. Что это? Поплыла одна, другая, третья — и вот уже во всем поле зрения появились подвижные бактерии, проворно и как-то деловито, осмысленно снующие в самых различных направлениях.

Удача? А может быть, капля кислоты просто разбавила яды?

Опыт повторяется, но вместо кислоты берется ка-

пелька воды. Нет эффекта: бактерии по-прежнему неподвижны. Еще один контроль: вместо кислоты добавляется щелочь. Эффекта нет и в этом случае.

А вдруг кислота разрушила какой-то из ядов? Это крайне маловероятно: ведь изменение кислотности среды в общем-то невелико. И тем не менее...

В работе с такой сложной системой, как живое существо, пусть даже мельчайшее, одноклеточное, всегда можно найти несколько объяснений любому факту. Однако стоящая гипотеза тем и хороша, что она не только объясняет старые факты, но и предсказывает новые. Именно так было установлено, что подвижность возвращается при добавке кислоты к отравленным ядами бактериям.

Что же, отправимся дальше по пути, указанному гипотезой. Легко сообразить, что движение, вызванное кислотой, должно быть явлением временным. По мере поступления ионов водорода в бактерию кислотность внутри клетки должна повышаться, так что в конце концов внутри станет так же «кисло», как снаружи. Это значит, что протонный потенциал рассеется и бактерия остановится.

Известно, что время, необходимое, чтобы уравнились концентрации ионов H^+ между бактерией и средой, измеряется несколькими минутами. Значит, вызванное кислотой движение должно прекратиться спустя минуты.

И действительно, через три минуты после добавки кислоты поле под микроскопом являло собой печальную картину, которую мы наблюдали в начале опыта: бактерии были неподвижны.

Вот вам и разрушение яда кислотой! Что же это он сначала разрушился, а потом, когда кислота проникла в клетку, опять образовался?

Конечно, нет.

А может быть, вообще клетка становится неподвижной, когда цитоплазма подкислилась?

Все может быть. Но заметьте, каждый следующий факт, предсказанный нашей гипотезой, требует от оппонента какого-нибудь нового предположения. Наша точка зрения ведет к новым фактам, противоположная — к новым предположениям.

И все же проверим, как влияет сама по себе кислотность среды на движение бактерий. Исключим из среды яд, мешавший производству протонного потенциала за

счет света, и посмотрим, не обездвижутся ли бактерии при подкислении среды. Оказывается, этого не происходит. В подкисленной среде бактерии весело плавают до тех пор, пока не выключишь свет.

Итак, к чему же мы пришли? Протонный потенциал движет бактерией. Но как? Есть только один путь: ионы H^+ входят в бактерию и «походя» вращают М-диск, а с ним и всю флагеллу. Почему ионы H^+ идут внутрь клетки? Да просто потому, что их снаружи больше, чем внутри. Ведь не зря же мы добавили HCl , которая в воде полностью диссоциирует на H^+ и Cl^- .

Если все это так, можно включить механизм движения и другим способом: создать, например, внутри клетки избыток отрицательных зарядов. Тогда даже при равенстве концентраций ионов H^+ внутри и снаружи клетки эти ионы будут поступать внутрь за счет электрических сил, перемещаясь от плюса к минусу.

Сказано — сделано! На стекле две капли. В одной неподвижные, отравленные ядовитой смесью бактерии, в другой еще один яд, антибиотик валиномицин. Этот агент резко повышает проницаемость мембран для ионов калия (K^+).

Раствор валиномицина, как и среда с бактериями, не содержит ионов K^+ . В то же время внутри бактерий много этих ионов. Если теперь слить две капли, то валиномицин атакует бактерии, повысит их калиевую проницаемость и разрешит ионам K^+ выйти из бактерии, где их избыток по сравнению с окружающим раствором.

Выходя, ионы K^+ зарядят внутренность клетки отрицательно, этот минус притянет K^+ , и, двигаясь внутрь, H^+ запустит протонный мотор. Бактерии поплывут. Таково предсказание гипотезы.

А что получилось в опыте на самом деле? Бактерии задвигались и вновь через положенное время, когда уравнились концентрации K^+ внутри и снаружи клетки, остановились.

Предвидя новое возражение оппонента (а вдруг валиномицин работал у нас не переносчиком калия, а кем-то еще), мы поставили контрольный эксперимент, где бактерии находились в среде с высоким содержанием калия. Теперь калия было много и внутри и снаружи клетки. В таких условиях валиномицин не включал механизма подвижности. Эффект валиномицина (а также и кислоты) можно было снять и другим способом: до-

бавив в среду разобщитель-протонофор и тем самым сведя к нулю протонный потенциал.

Наши данные по движению пурпурных бактерий были опубликованы у нас в «Биохимии» и за рубежом — в «Нэйчер». Вскоре появились сообщения из США и Японии, где аналогичные результаты получились в опытах на стрептококке и *Bacillus subtilis*. Параллельно мы проделали такую же работу с классическим объектом микробиологов — кишечной палочкой.

А совсем недавно Т. и А. Глаголевыми и М. Гусевым и К. Никитиной было доказано, что нитчатые сине-зеленые водоросли также используют протонный потенциал для своего скользящего движения по поверхности твердого субстрата.

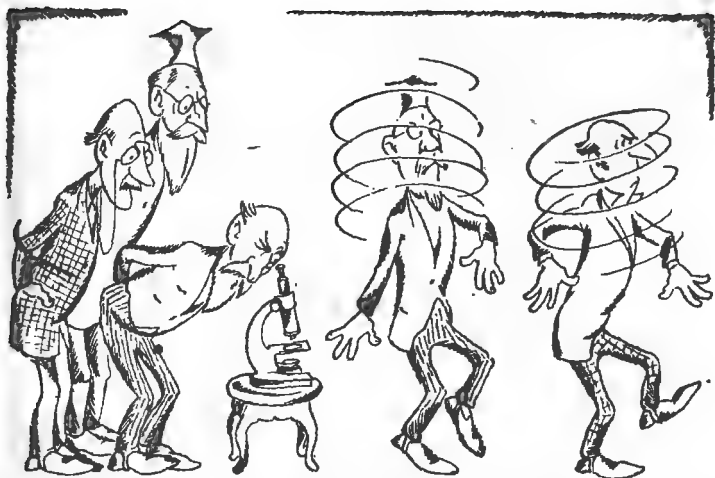
Это последнее наблюдение свидетельствует, что протонный мотор, однажды изобретенный природой, применяется не только у бактерий, имеющих жгутики. У сине-зеленых водорослей жгутиков нет. Их роль выполняют, по-видимому, фибриллы, лежащие между внешней и цитоплазматической мембранами этих организмов.

Сине-зеленые водоросли относятся к царству бактерий (у них есть даже другое название — цианобактерии). А могут ли организмы, принадлежащие к высшим царствам живой природы, двигаться за счет протонного потенциала? Чтобы ответить на этот вопрос, мы занялись движением хлоропластов.

ВРАЩЕНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ

В тридцатые годы прошлого века французская академия получила от некоего мсье Донне удивительное сообщение. Корреспондент писал, что им обнаружено вращательное движение каких-то частиц в капле протоплазмы, выдавленной из харовой водоросли. Вращение, направленное в одну и ту же сторону, можно было наблюдать под микроскопом в течение многих минут, причем все это время его скорость оставалась постоянной (примерно один оборот за одну-две секунды).

Академия, осаждаемая изобретателями вечных двигателей, не решилась опубликовать заметку Донне. Создали комиссию для проверки поразительного эффекта. Наблюдение полностью подтвердилось. Доклад комиссии опубликовали в «Академических трудах» в 1838 году, после чего то ли Донне проявил настойчивость, то ли сами академики спохватились, но так или иначе за-



метка этого автора наконец увидела свет в одном из следующих выпусков тех же «Трудов».

В те далекие времена биология что ни год приносила поистине великие открытия. Поэтому неудивительно, что эффект Донне, абсолютно непонятный по своей природе, прочно забыли, с тем чтобы вновь открыть по крайней мере дважды в течение следующих 140 лет.

Новые исследователи загадочного эффекта выяснили, что частицы, вращающиеся в каплях протоплазмы харовой водоросли, не что иное, как хлоропласты, содержащие хлорофилл — органеллы высших растений (о хлоропластах шла речь выше, в главе, посвященной преобразованию энергии света в растительных клетках).

Но почему, за счет каких сил вращаются хлоропласты? Немногочисленные специалисты-цитологи, занимавшиеся этой экзотической проблемой лет двадцать-тридцать назад, считали, что вращение хлоропластов имеет ту же природу, что и так называемый циклоз — круговое движение протоплазмы в клетках харовых водорослей. Энергия для циклоза доставляется АТФ, который расщепляется особыми ворсинками, обращенными внутрь гигантской клетки харовой водоросли. Биение этих ворсинок движет протоплазму и, как думали цитологи, вращает хлоропласты.

Меня давно занимала проблема происхождения хлоропластов и митохондрий. Существует гипотеза, что и

те и другие органеллы произошли из бактерий, когда-то захваченных более крупной клеткой гриба или протиста, например, какой-нибудь амебы. Действительно, у хлоропласта много общих черт с цианобактерией, а у митохондрии с некоторыми видами дышащих бактерий.

Так, может быть, механизм вращения хлоропластов устроен как у бактерий: по типу протонного мотора?

Е. Моценок, приехав к нам на стажировку из лаборатории Д. Стома, что в Иркутске, захватила с собой байкальские водоросли рода нителла. Как выяснилось, такой объект вполне пригоден для изучения эффекта Донне. Когда я впервые увидел своими глазами это явление, меня прежде всего поразило сходство вращающегося хлоропласта и «пойманной за хвост» бактерии, о которой шла речь в предыдущей главе. Но, может быть, мы столкнулись здесь со случайным, внешним подобием?

Моценок провела подробнейший анализ вращения хлоропластов с точки зрения энергетики этого процесса. Она наблюдала за хлоропластами в специальный микроскоп, используя инфракрасный свет для освещения объекта. Такой свет не поглощается хлорофиллом и не может быть использован энергетической системой хлоропластов.

В раствор был добавлен яд, отравляющий протонную АТФ-синтазу, чтобы блокировать взаимопревращение энергии между протонным потенциалом и АТФ. В таких условиях вращения не обнаруживалось. Включение белой подсветки «заводило» вращение. Движение хлоропласта исчезало вновь спустя примерно минуту после выключения подсветки.

Вращение прекращалось при введении веществ, тормозящих генерацию протонного потенциала на мембране хлоропласта или снижающих уже образованный потенциал. Так действовали диурон, прерывающий перенос электронов при фотосинтезе, протонофоры, а также ионы аммония, уменьшающие трансмембранную разность концентраций водородных ионов — главную составляющую протонного потенциала хлоропластов.

Зато арсенат, вызывающий истощение запаса АТФ, не влиял на вращение хлоропластов. Оно не тормозилось также цитохалазином, ингибитором всех известных внутриклеточных движений, поддерживаемых энергией АТФ.

Все эти факты свидетельствуют, что хлоропласты

используют для своего вращения протонный потенциал. Значит, в них есть протонные моторы?

Где находятся эти моторы, как они устроены, есть ли жгутики у хлоропластов, — все эти вопросы еще ждут своего решения. Что касается биологической функции двигательного аппарата хлоропластов, то она, по-видимому, может состоять в следующем. В гигантских клетках нителлы или харовой водоросли есть очень большое количество хлоропластов, которые плотно упакованы в многослойные образования, занимающие большую часть клетки между оболочкой и свободной частью цитоплазмы. Свободная цитоплазма находится в движении, которое поддерживается биением мельчайших ворсинок, обращенных в просвет цитоплазмы. Это движение способствует перемешиванию внутриклеточного содержимого. Когда сахара, образующиеся при фотосинтезе в хлоропластах, достигают свободной цитоплазмы, они увлекаются ее током и тем самым становятся достоянием всей клетки.

Но как сахарам добраться до свободной цитоплазмы? Вряд ли здесь можно рассчитывать на конвекцию: слишком уж узки щели между хлоропластами.

Хлоропласты в клетке неподвижны: они зажаты своими ближайшими соседями. Поэтому протонные моторы хлоропластов должны на первый взгляд работать вхолостую: вращать жгутики или фибриллы без всякого перемещения хлоропласта в пространстве. Но, может быть, именно это и есть их функциональный режим: например, жгутик, вращаясь, перемешивает жидкость в щелях между хлоропластами и ускоряет таким способом перемещение сахаров из хлоропластов в свободный слой цитоплазмы. Не будь такого механизма, именно этот этап — от хлоропласта до свободной цитоплазмы — лимитировал бы весь процесс транспорта сахаров в клетках водорослей.

В рамках такой гипотезы вращение хлоропластов в выдавленных каплях протоплазмы есть просто артефакт, связанный с освобождением отдельных хлоропластов из плена, в котором они находились внутри клетки.

Так или иначе, выяснение того обстоятельства, что хлоропласты располагают какими-то протонными моторами, свидетельствует о достаточно широком распространении в природе такого рода устройств, первоначально обнаруженных у флагеллярных бактерий.

ДВОЙНАЯ БУХГАЛТЕРИЯ ЖИВОЙ КЛЕТКИ

В 1941 году Ф. Липман выдвинул концепцию, ставшую одним из краеугольных камней в здании биоэнергетики. Он предположил, что существует некий унифицированный посредник между процессами-поставщиками и процессами — потребителями энергии. Этим посредником, как утверждал Липман, служит АТФ. Формулируя свою гипотезу, ученый основывался на том факте, что как дыхание, так и брожение могут образовывать АТФ, а синтез углеводов и некоторые другие синтетические процессы, уже изученные к тому времени, сопровождаются расщеплением АТФ.

Последующие годы подтвердили правильность догадки Липмана. Описали образование АТФ за счет энергии света в клетках фотосинтезирующих организмов. Резко расширился список реакций использования АТФ. В него на сегодня вошли не только важнейшие биосинтезы, но также и ряд процессов совершения механической, осмотической и электрической работы, а также продукции тепла.

Схему Липмана не смогло поколебать открытие процессов, использующих энергию других, неадениловых нуклеозидтрифосфатов — гуанозинтрифосфата (ГТФ); уридинтрифосфата (УТФ); цитидинтрифосфата (ЦТФ). Все это аналоги, «близкие родственники» аденозинтрифосфата, которые получают непосредственно из АТФ.

«Монополия» АТФ устояла и тогда, когда были обнаружены процессы, обеспечиваемые энергией фосфопировата, фосфоацетата и неорганического пирофосфата. Все эти реакции, вместе взятые, составляют лишь очень небольшую долю от общего потребления энергии живой клеткой.

Свою хемиосмотическую гипотезу Митчел выдвинул через двадцать лет после публикации схемы Липмана. Введя понятие протонного потенциала, Митчел утверждал, что роль этого компонента в энергетике клетки сводится к функции мимолетного промежуточного продук-

та, образуемого дыханием и потребляемого АТФ-синтазой.

В 1961 году было неясно, выполняет ли протонный потенциал такую функцию и существует ли он вообще. Биоэнергетикам потребовалось около десяти лет, чтобы ответить на эти два вопроса. Ответ, оказавшийся положительным, повлек за собой новый вопрос: ограничивается ли роль протонного потенциала его участием в дыхательном и фотосинтетическом фосфорилировании?

Вскоре стало очевидным, что протонный потенциал используется не только при синтезе АТФ, но и при обратном переносе электронов по дыхательной цепи. Затем у одной из бактерий обнаружили образование неорганического пирогосфата из двух молекул фосфорной кислоты за счет энергии протонного потенциала. Тем самым было показано, что синтез АТФ главный, но не единственный вид химической работы, производимой протонным потенциалом.

Шли годы, приносящие все новые сведения о биологической роли протонного потенциала. По существу, в биоэнергетике началась переоценка ценностей: старые, давно известные энергетические процессы заново исследовали на предмет их отношения к вновь открытому компоненту — протонному потенциалу.

Прежде всего, конечно, рассмотрели явления, так или иначе связанные с мембранами. И тут оказалось, что множество процессов осмотической работы по концентрированию веществ «оплачиваются» протонным потенциалом. Большое количество самых разнообразных веществ поступает в бактериальную клетку, двигаясь под действием электрического поля или разности концентраций ионов H^+ .

Все известные сегодня процессы переноса веществ через мембрану митохондрий происходят за счет протонного потенциала. Треть всей энергии, потребляемой митохондриями для синтеза АТФ, так сказать на экспорт, для немитохондриальных частей клетки, идет не на реакцию образования АТФ как таковую, а на концентрирование АДФ и фосфата внутри митохондрий и откачку синтезированного АТФ из митохондрий в цитоплазму. Движущей силой этих транспортных процессов служит протонный потенциал. Он же поддерживает концентрирование в митохондриях карбоновых кислот, окисляемых при дыхании.

Даже такая специфическая функция, как образование дополнительных количеств тепла при охлаждении теплокровных животных, и та оказалась связанной с использованием протонного потенциала. Это терморегуляторное разобщение дыхания и синтеза АТФ, явление, о котором мы уже говорили, когда речь шла о мышцах стриженных голубей и буром жире хомяка.

С открытием движения бактерий за счет протонного потенциала пала последняя «монополия» АТФ, считавшегося единственной валютой, способной оплатить механическую работу клетки.

Итак, протонный потенциал может совершать различные виды химической, осмотической, механической работы, а также служит источником образования тепла. Если учесть, что первичная форма протонного потенциала — это разность электрических потенциалов на мембране, то мы вправе сделать следующий вывод: протонный потенциал наряду с АТФ есть конвертируемая форма энергии в живой клетке.

Действительно, протонный потенциал, как и АТФ, образуется несколькими путями в реакциях утилизации внешних энергетических ресурсов. Затем он используется по целому ряду каналов, совершая, подобно АТФ, все основные виды работы, характерные для живой системы.

Сравним для примера роль АТФ и протонного потенциала в энергетике клетки млекопитающего животного. Здесь есть четыре ферментные системы, образующие АТФ (главная среди них — протонная АТФ-синтетаза митохондрий) и три системы, генерирующие протонный потенциал (цитохромоксидаза и другие белки — генераторы, включенные в дыхательную цепь).

Образованный АТФ используется затем главным образом для синтеза биополимеров и их составных частей, а также для транспорта некоторых веществ (в основном через внешнюю мембрану клетки) и энергообеспечения механохимических (сократительных) систем клетки.

Протонный потенциал питает митохондриальную АТФ-синтетазу, поддерживает транспорт АТФ, АДФ, фосфата и карбоновых кислот через мембрану митохондрии. Кроме того, он разворачивает всячь определенные окислительные реакции, которые становятся в результате не потребителями, а поставщиками водорода, используемого затем во многих восстановительных синтезах. Если добавить к этому процессы транспорта ионов



кальция и некоторых других веществ в митохондриях, а также расход протонного потенциала на образование тепла, то окажется, что не более половины энергии, превращенной в протонный потенциал, используется АТФ-синтетазой. Поэтому функция промежуточного продукта в АТФ-синтетазной реакции — это лишь половина дела, которое в действительности делает протонный потенциал.

Еще разнообразней пути использования протонного потенциала у бактерий. Здесь и механическая работа по вращению жгутиков, и транспорт широкого круга веществ — от ионов калия до ДНК, и синтез пиррофосфата.

Так от исходной концепции Митчела, рассматривавшего протонный потенциал всего лишь как связующее звено между дыханием и фосфорилированием, мы пришли к ситуации, когда необходимо изменить «добрую старую» Липманову схему с ее постулатом об АТФ как единственной конвертируемой форме энергии в организме. Оказалось, что живая клетка располагает не одной, а двумя «валютами» для оплаты своих энергетических потребностей. Одна из них химическая, удобная для использования в водной фазе клетки. Это АТФ — вещество, отлично растворимое в воде, но крайне неподходящее для работы внутри мембран из-за нерастворимости в жиру. Другая «валюта» электрохимическая, не-

разрывно связанная с гидрофобной, мембранной, фазой той же клетки. Это протонный потенциал.

Сейчас уже трудно сказать, когда клетка завела себе такую «двойную бухгалтерию», оплачивая одни свои функции аденозинтрифосфатом, а другие — протонным потенциалом. Ясно лишь, что это случилось очень давно и такая двойственность характерна для всех ныне живущих организмов.

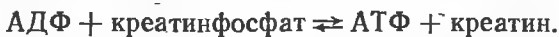
Это верно и для форм жизни, никогда не использующих протонный потенциал как сопрягающий фактор в том смысле, который первоначально предполагал Митчелл. Были описаны анаэробные бактерии, синтезирующие АТФ единственным способом — за счет брожения. Протонный потенциал для этого не нужен. И тем не менее он образуется на мембране бактерий путем расщепления АТФ протонной АТФазой. Образовавшись, протонный потенциал используется затем для совершения, например, осмотической работы.

**ЗАЧЕМ КЛЕТКА ОБМЕНИВАЕТ
НАТРИЙ НА КАЛИЙ?**

Мысль о двух формах конвертируемой энергии я высказал в 1975 году. Спустя два года эта точка зрения была поддержана Митчеллом. А в группе А. Глаголева тем временем начались опыты по проверке одного из предсказаний этой новой концепции.

Я рассуждал следующим образом. Если протонный потенциал — разменная монета, то клетка должна располагать достаточным количеством таких «денежных знаков».

Это требование выполнялось, если речь шла об АТФ. Клетка всегда содержит довольно большие количества АТФ, причем приняты меры для стабилизации этого количества в условиях меняющейся конъюнктуры — непрерывно варьирующих скоростей образования и использования АТФ. Есть особое вещество — креатинфосфат, участвующее только в одной реакции — фосфорилировании АДФ:



Когда АТФ в избытке, а АДФ в дефиците, реакция идет справа налево и накапливается креатинфосфат, которого в этих условиях становится много больше, чем АТФ. Но стоит повыситься уровню АДФ и уменьшиться АТФ, как реакция меняет направление, и креатинфос-

фат оказывается поставщиком АТФ. Тем самым креатинфосфат выполняет свою функцию стабилизатора, буфера уровня АТФ.

А как обстоят дела с протонным потенциалом?

Несложный расчет позволяет перевести одну энергетическую «валюту» в другую. Этот расчет показывает, что количество энергии, накопленное, к примеру, бактериальной клеткой в виде протонного потенциала, оказывается почти в тысячу раз меньшим, чем количество АТФ, если протонный потенциал находится в электрической форме. Это количество одного порядка с числом генераторов и потребителей потенциала в бактериальной мембране.

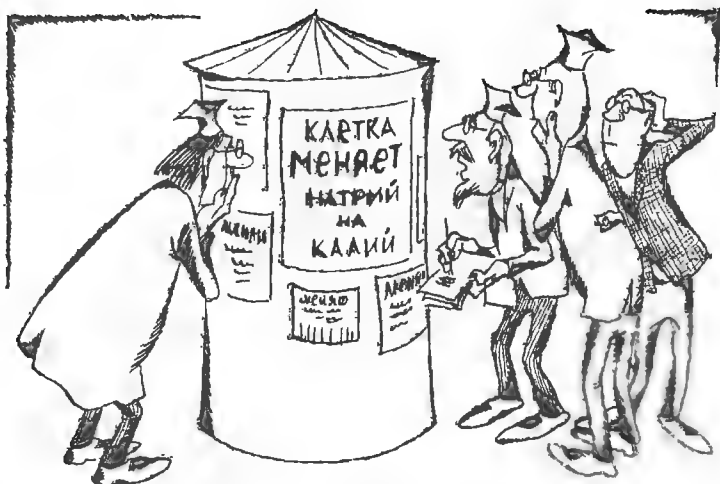
Такая ситуация создает особую необходимость в буферной системе, стабилизирующей уровень протонного потенциала. В противном случае даже кратковременное превышение общей скорости потребляющих потенциал процессов над скоростью его генерации приведет к исчезновению потенциала и остановке всех систем, питаемых потенциалом.

Итак, должен быть буфер для протонного потенциала наподобие креатинфосфата для АТФ. Но что за компонент подобрала природа на такую роль?

Обдумывая эту проблему, я попытался найти какую-нибудь связанную с потенциалом биологическую систему, функция которой была бы неизвестна.

Одна из старых загадок биологии: зачем клетка поглощает ионы калия и выбрасывает ионы натрия, создавая дорогостоящую асимметрию в распределении этих близких по своим свойствам ионов между цитоплазмой и окружающей средой? Практически в любой живой клетке ионов калия намного больше, чем ионов натрия, в то время как в среде натрия находится в огромном избытке над калием. Может быть, Na^+ — яд для клетки?

Нет, это не так. Хоть некоторые ферментные системы действительно лучше работают в KCl , чем в NaCl , это выглядит вторичным приспособлением к «многокалиевой» и «малонатриевой» внутренней среде клетки. За огромный срок биологической эволюции клетка могла бы приспособиться к естественному соотношению ионов щелочных металлов во внешней среде. Живут же галофильные бактерии в насыщенном растворе NaCl , причем концентрация Na^+ в их цитоплазме иногда дохо-



дит до моля на литр, что почти в тысячу раз больше концентрации Na^+ в обычных клетках. Итак, Na^+ не яд.

Заметим, что те же галофильные бактерии поддерживают внутриклеточную концентрацию K^+ около 4 молей на литр, тратя на создание натрий-калиевого градиента колоссальные по масштабам клетки количества энергетических ресурсов.

Известно, что возбудимые клетки животных, такие, как нейроны, используют натрий-калиевый градиент для проведения нервного импульса. Но как быть с другими типами клеток, например, с бактериями?

Давайте обратимся к механизму транспорта K^+ и Na^+ через бактериальную мембрану. Известно, что между цитоплазмой бактерии и внешней средой существует разность электрических потенциалов, поддерживаемая работой белков-генераторов в бактериальной мембране. Откачивая протоны изнутри клетки наружу, белки-генераторы тем самым заряжают внутренность бактерии отрицательно. В этих условиях накопление ионов K^+ внутри клетки могло бы происходить просто за счет электрофореза — движения положительно заряженного иона калия в отрицательно заряженную цитоплазму бактерии.

При этом поток калия должен разряжать мембрану, предварительно заряженную протонными генераторами.

В свою очередь, разрядка мембраны должна немедленно активировать работу генераторов.

Это означает, что энергетические ресурсы, затрачиваемые на генерацию разности электрических потенциалов между клеткой и средой, будут использованы для концентрирования ионов K^+ внутри клетки. Конечным балансом такого процесса окажется обмен внутриклеточных ионов H^+ на внеклеточные ионы K^+ (ионы H^+ откачиваются белками-генераторами наружу, ионы K^+ поступают внутрь, двигаясь в электрическом поле, созданном движением ионов H^+).

Стало быть, внутри клетки будет создаваться не только избыток ионов K^+ , но и дефицит ионов H^+ .

Этот дефицит можно использовать для откачки ионов Na^+ . Сделать это можно следующим образом. Известно, что бактерии располагают особым переносчиком ионов натрия, обменивающим Na^+ на H^+ (этот переносчик носит название Na^+/H^+ -антипортера). В условиях нехватки H^+ в цитоплазме антипорт может компенсировать протонный дефицит, перенося H^+ из внешней среды внутрь клетки. Произвести такой антипорт переносчик может только одним способом: обменяв внешний H^+ на внутренний Na^+ . Значит, движение ионов H^+ внутрь клетки может быть использовано для откачки из той же клетки ионов Na^+ .

Вот мы и создали калий-натриевый градиент: внутри клетки накопили K^+ и откачали оттуда Na^+ . Движущей силой этих процессов был создаваемый белками-генераторами протонный потенциал. (Направление потенциала было таково, что внутренность клетки заряжалась отрицательно и там возникала нехватка ионов водорода.)

Допустим теперь, что протонные генераторы по какой-то причине выключились. Что произойдет в этих новых условиях с калий-натриевым градиентом?

Конечно же, он рассеется: ионы K^+ вытекут из клетки в окружающую среду, где их мало, ионы Na^+ войдут внутрь, где эти ионы в дефиците.

Но вот что интересно. Рассеиваясь, калий-натриевый градиент сам окажется генератором протонного потенциала того же направления, что образовывался при работе белков-генераторов.

Действительно, выход иона K^+ как положительно заряженной частицы создает диффузионную разность по-

тенциалов на клеточной мембране со знаком «минус» внутри клетки. Вход Na^+ при участии Na^+/H^+ -антипортера будет сопровождаться выходом H^+ , то есть созданием дефицита H^+ внутри клетки.

Так что же получается? Когда белки-генераторы работают, создаваемый ими протонный потенциал расходуется на образование калий-натриевого градиента. Зато когда они выключены (или их мощности недостает, чтобы удовлетворить многочисленных потребителей потенциала), калий-натриевый градиент, рассеиваясь, сам начинает генерировать протонный потенциал.

Так ведь это и есть буфер протонного потенциала, тот самый буфер, который так необходим для работы мембранных энергетических систем!

Схематично эту концепцию можно изобразить так:

калий-натриевый градиент
↑ ↓

внешние энергетические ресурсы → протонный потенциал → работа.

Но если такая схема верна, то калий-натриевый градиент должен продлить работоспособность клетки в условиях, когда исчерпаны энергетические ресурсы.

А. Глаголев и И. Броун проверили справедливость этого вывода. Был взят мутант кишечной палочки, лишенный протонной АТФ-синтетазы. Для такого мутанта окисление субстратов кислородом служит единственным энергетическим ресурсом, пригодным, чтобы образовать протонный потенциал. Как было показано в свое время Дж. Адлером и его сотрудниками, мутант подвижен, пока в среде есть кислород.

Глаголев и Броун повторили опыт Адлера и убедились, что исчерпание запаса кислорода в растворе действительно останавливает бактерии, если они находятся в среде с KCl . В этих условиях калий-натриевый градиент отсутствует: калия много и в клетках и в среде, а натрия нет ни там, ни здесь.

А теперь давайте возьмем среду с NaCl . В таких условиях должны быть оба интересующих нас градиента: калиевый (калия много внутри и мало снаружи) и натриевый (натрия много снаружи и мало внутри). Гипотеза предсказывала, что в такой ситуации подвижность сохранится какое-то время и в бескислородных условиях, поскольку возможно превращение энергии:

калий-натриевый градиент → протонный потенциал →
→ вращение флагеллы.

И в самом деле, бактерии двигались еще 15—20 минут после того, как измерительное устройство зарегистрировало нулевой уровень O_2 в среде.

Но особенно наглядным, как и следовало ожидать, оказался опыт с соеллюбивыми бактериями, которые транспортируют очень большие количества ионов K^+ и Na^+ , чтобы создать калий-натриевый градиент. Такие бактерии быстро останавливались в темноте в бескислородных условиях, если в среде был KCl , и все еще двигались спустя девять (!) часов, если KCl был заменен на $NaCl$.

Эта величина — девять часов — интересна прежде всего как иллюстрация объема того резервуара энергии, который представляет собой калий-натриевый градиент у соеллюбивых бактерий. Кроме того, она приобретает особый смысл, если вспомнить о том, что соеллюбивые бактерии располагают бактериородопсином и, стало быть, способны к превращению энергии света в протонный потенциал. Ясно, что такое превращение возможно лишь в светлый период суток. А как быть ночью? Так вот оказывается, что энергии, запасенной днем в виде калий-натриевого градиента, хватает на всю ночь.

Утверждение, что калий-натриевый градиент играет роль буфера протонного потенциала, позволяет понять не только биологическую функцию этого градиента, но и причину, которая в течение многих лет препятствовала выяснению его значения для жизнедеятельности клетки. Мысль о буферной роли калий-натриевого градиента не могла родиться, прежде чем был открыт протонный потенциал и было доказано, что он служит конвертируемой формой энергии. Все эти годы проблема калия и натрия просто ждала своего часа.

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ КАБЕЛЬ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Другая проблема, долго дождавшаяся своего срока, — это передача энергии вдоль мембраны. С самого начала хемиосмотической эпопеи мне казалось очевидным, что разность электрических потенциалов весьма удобна для транспорта энергии в пределах клетки. Дело в том, что система из двух солевых растворов, разделенных мембраной с ее свойствами превосходного изолятора, могла бы действовать в режиме электрического кабеля.

Солевые растворы — проводники с очень низким сопротивлением, мембрана — структура, сопротивление которой очень высоко. Поэтому электрическое поле, созданное, например, переносом H^+ через мембрану в какой-то ее точке, должно немедленно распространиться по всей мембране.

Транспортабельность — необходимое свойство конвертируемой формы энергии. Поскольку разность электрических потенциалов является достоянием мембраны в целом, она должна объединять тысячи вмонтированных в нее генераторов и потребителей протонного потенциала в единую систему энергообеспечения бактерии, митохондрии или хлоропласта.

Все они имеют, как принято считать, микронные размеры. Расчет показывает, что передача потенциала на такие расстояния идет практически без потерь. Потери невелики и при значительно больших расстояниях — вплоть до нескольких миллиметров. Но есть ли столь протяженные мембранные образования, генерирующие протонный потенциал?

Аналогия мембраны с электрическим кабелем давно используется нейробиологами: распространение нервного импульса вдоль весьма протяженных мембран аксона происходит как по кабелю. Однако это передача сигнала, а не электрической мощности, которую необходимо использовать для совершения работы. Да и протонных генераторов нет в аксоне.

Вот если бы митохондрия или бактерия была длиной в несколько миллиметров, тогда можно было бы говорить об электропроводке и передаче мощности.

А нет ли в природе длинных митохондрий? Само слово «митохондрия» в переводе означает «нить-зерно». Действительно, рассматривая клетку под световым микроскопом, цитологи давно уже обратили внимание на то, что митохондрии бывают двух типов: вытянутые, нитевидные и округлые, шарообразные. Диаметр нитевидных митохондрий столь мал, что световой микроскоп не позволяет надежно ответить на вопрос, где кончается одна митохондрия и начинается другая.

Чтобы повысить разрешение, прибегают к помощи электронного микроскопа. Через ткань или клетку делают срез и затем фотографируют его, используя вместо светового луча пучок электронов. На срезах митохонд-

рии почти всегда выглядят как мембранные пузырьки округлой формы.

Это не удивительно: поперечный срез через нить, как и через шарик, даст нечто круглое. Такое, казалось бы, очевидное обстоятельство долгое время игнорировалось электронными микроскопистами, которые упорно считали митохондрии мелкими шаровидными или овальными образованиями.

Ошибка выяснилась, как только начали применять метод серийных срезов. Через клетку простейшего сделали несколько десятков параллельных срезов, сфотографировали их под электронным микроскопом, а затем воссоздали истинную трехмерную структуру митохондрий внутри клетки этого организма.

Сколь велико было удивление исследователей, когда выяснилось, что в клетке вместо десятков и сотен округлых митохондрий есть всего одна гигантская сетчатая митохондрия, более всего напоминающая авоську. Она располагается под внешней мембраной клетки по всей ее протяженности, так что размер митохондрии оказывается соизмерим с размером самой клетки.

Гигантские сетчатые митохондрии были обнаружены не только у простейших, но также и у дрожжей и некоторых других одноклеточных организмов. Утвердилось даже мнение, что такие большие митохондрии — специфика одноклеточных.

Открытие гигантских митохондрий относится к семидесятым годам. Оно сильно укрепило меня в перспективности поиска электропроводки, существование которой я постулировал в 1969 году, исходя из самых общих соображений.

Следующим важным этапом стало изучение мышечных митохондрий. Клетка мышцы достигает огромных размеров. Ее энергетические потребности очень велики, а диффузия АТФ и окисляемых соединений затруднена ввиду того, что клетка буквально набита плотно упакованными структурами — тяжами сократительного белка актомиозина.

Как-то раз Л. Бакеева, сотрудница нашего отдела электронной микроскопии, показала мне странную микрофотографию. На срезе мышцы крысиной диафрагмы была видна сеть каких-то темных структур, пронизывающая все тело мышечной клетки. По форме эти структуры были так необычны, что я не сразу признал

в них митохондрии. Внимательно рассмотрев фотографию, мы убедились, что срез прошел вблизи так называемого Z-диска, особого белкового образования, к которому крепятся актомиозиновые тяжи. Плоскость среза оказалась строго параллельной Z-дису.

Митохондрии в мышце формируют сеть? Чтобы проверить, не случайно ли наше наблюдение, мы углубились в литературу по ультраструктуре мышечной ткани. «Раскопки» показали, что в 1966 году некто Х. Бубенцер из ФРГ и независимо Г. Готье и Х. Падикула из Франции наблюдали сетевидные митохондрии в мышце диафрагмы. Авторы использовали одиночные срезы и потому не могли получить точного представления о структуре митохондриальной сети в целом.

Бакеева приготовила серийные ультратонкие срезы мышцы диафрагмы. Расстояние между соседними срезами было меньше одного микрона, количество срезов — 45. В результате этой технически очень сложной работы было получено 45 микрофотографий, по которым удалось воссоздать истинную картину строения митохондрий в диафрагме. Из розового дентального воска Бакеева вылепила модель, форма которой точно соответствовала митохондриальным структурам мышцы, но была увеличена в десять тысяч раз. И вот тут-то нам открылась истинная картина строения мышечных митохондрий.

Она оказалась поистине удивительной. Кружки и эллипсы, видные на одиночных срезах, в действительности были сечением через различные элементы единой трехмерной конструкции, пронизывающей всю мышечную клетку. Конструкция состояла из сетей, расположенных вблизи Z-дисков, и колонн, перпендикулярных сетям и соединяющих их друг с другом. Ни одной шарообразной митохондрии, не связанной с основным каркасом, обнаружено не было.

Для этой новой структуры я предложил название «reticulum mitochondriale» (митохондриальный ретикулум по аналогии с уже известным эндоплазматическим ретикулумом — системой мельчайших мембранных цистерн, ответственных за обратимое поглощение ионов кальция внутри мышечной клетки). Но про себя называл хитросплетение мышечных митохондрий внутриклеточной электропроводкой, свято веря, что если уж мышечное волокно пронизано мембранами, которые на-

ходятся под напряжением в четверть вольта, то сам бог велел использовать их для передачи электрической энергии. Такая электропроводка могла бы резко облегчить ситуацию в тяжело работающей мышце, испытывающей острый энергетический дефицит.

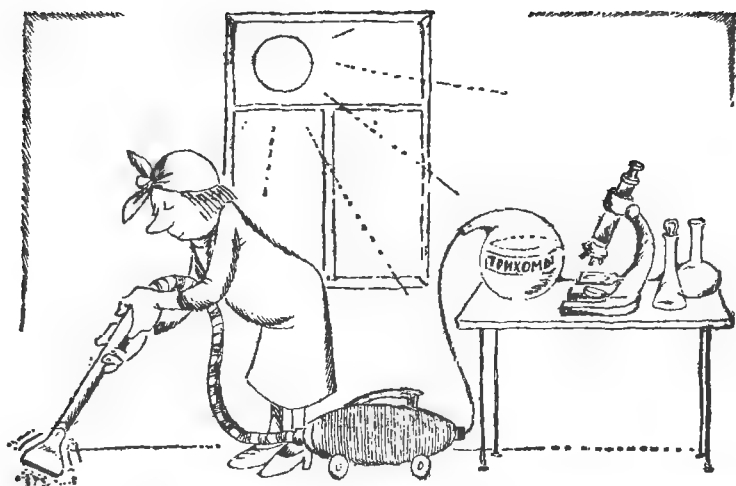
Свидетельство в пользу особого значения митохондриального ретикулума для мышечной работы было получено при исследовании становления этой структуры в процессе формирования диафрагмы. Мышца диафрагмы бездействует у эмбриона и начинает функционировать с первым вздохом новорожденного. Учитывая это обстоятельство, Ю. Ченцов, шеф микроскопистов в нашей лаборатории, предложил Л. Бакеевой сравнить структуру митохондрий диафрагмы у крысиного эмбриона перед самым рождением и у однодневного крыска.

Как и следовало ожидать, митохондриальный ретикулум отсутствовал в бездействующей диафрагме эмбриона. Здесь были лишь немногочисленные, вытянутые, лежащие отдельно митохондрии, ориентированные перпендикулярно Z-дискам.

После рождения количество митохондрий резко возросло, эмбриональные митохондрии вытянулись, утолщились и начали ветвиться в области Z-дисков. Через неделю уже ясно просматривались контуры будущих сетей, параллельных Z-дискам и перпендикулярных эмбриональным митохондриям, превратившимся в колонны, поддерживающие сети. К концу четвертой недели после рождения формирование митохондриального ретикулума было почти закончено.

Итак, в неработающей мышце, где нет больших энергетических затрат, нет и митохондриального ретикулума. Он появляется после включения основной, сократительной, функции мышцы. Такая ситуация вполне разумна, если принять, что митохондриальный ретикулум — электропроводка. Но как это доказать прямым экспериментом?

Наличие протяженных митохондриальных мембран — условие, необходимое, но недостаточное, чтобы признать за ними роль электропроводки. Более того, предполагая передачу электрической мощности вдоль мембран вновь открытого ретикулума, я не мог опереться на аналогию с какой-нибудь другой биологической мембраной (нервные волокна не в счет: там пере-



дается не электрическая мощность, а сигнал, причем энергия в конечном итоге рассеивается).

В биологии, как в английском законодательстве, очень важен прецедент. Как правило, живая природа, изобретя что-либо стоящее, затем многократно использует свое открытие всюду, где предоставляется такая возможность.

Митохондриальный ретикулум — это тончайшая паутинка, вплетенная в структуру мышечного волокна. Поперечник даже наиболее толстых тяжей ретикулума измеряется долями микрона. Передачу электричества по столь тонкому кабелю нельзя измерить прямо: даже самые тонкие электроды слишком громоздки для такой операции. Но нет ли других, более подходящих для исследования протяженных мембран, генерирующих протонный потенциал? Я вновь и вновь пытался найти такого рода объект, однако всякий раз проблема представлялась технически слишком сложной, чтобы дело дошло до эксперимента.

И тем не менее я не терял надежды. Мысль об электропроводке возникла в 1968 году. Прошло без малого семь лет, пока она воплотилась в опыты, которые привели к открытию митохондриального ретикулума в мышцах. И вот теперь мне нужен был организм, где передачу электрической мощности можно было бы измерить прямым методом.

Шли годы, меня занимали другие идеи и опыты, но задача по электропроводке не была забыта. Я терпеливо ждал подходящего случая. Он представился, когда А. Глаголевым был установлен факт движения нитчатых цианобактерий за счет энергии протонного потенциала.

Многоклеточный организм цианобактерий (трихом) состоит из сотен клеток, соединенных конец в конец. Цитоплазма каждой из них окружена мембраной, в которой есть генераторы протонного потенциала. В литературе удалось найти указание на то, что иногда между соседними клетками в трихоме видны мельчайшие каналы. Если бы эти каналы были хорошо проницаемы для электролитов, то трихом мог бы оказаться единой электрической системой, обладающей кабельными свойствами.

Сначала А. и Т. Глаголевы поставили такой несложный опыт. Были подобраны условия, когда свет служил единственным источником энергии для генерации протонного потенциала цианобактериями. Трихомы были неподвижны, пока не включался свет, поглощавшийся бактериальным хлорофиллом. Вопрос состоял в том, будет ли двигаться трихом, если освещена лишь небольшая его часть? Если между клетками в трихоме существует передача энергии, то, освещая часть трихома, можно образованную там электроэнергию передать в затемненные участки и питать ею все протонные моторы этого трихома.

Луч света сфокусировали таким образом, чтобы световое пятно покрыло всего 4—5 процентов от общей длины трихома. Оказалось, что в этих условиях трихом сохраняет свою подвижность.

Первое предсказание «кабельной гипотезы» оправдалось. Но может быть, для движения трихома хватает мощности тех моторов, которые находятся в его освещенной части? Тогда освещенный участок будет тянуть весь трихом, как электровоз везет за собой железнодорожный состав.

Эта возможность была исключена следующим опытом. Трихомы перенесли с поверхности агара, на котором проводили предыдущий эксперимент, в водный раствор. В жидкой среде цианобактерии неподвижны: их двигательный аппарат устроен таким образом, что они могут ползти, но не умеют плавать. Однако протон-

ные моторы продолжают работать и в воде, несмотря на отсутствие поступательного движения. Об этом свидетельствует вращение колец слизи, выделяемой цианобактериями.

Будут ли вращаться кольца слизи на одном конце трихома, если световое пятно расположить на противоположном его конце? Оказалось, что такое освещение вызывает вращение колец не только под световым пятном, но также и в других участках трихома, включая удаленный от света конец.

Этот факт говорил против «гипотезы электровоза», свидетельствуя в пользу передачи энергии по всей длине трихома. Но в какой форме передается энергия? Может быть, это АТФ, глюкоза или какой-либо другой продукт фотосинтеза, образующийся в освещенной части трихома и диффундирующий в его затемненные участки?

Такое объяснение казалось нам маловероятным прежде всего потому, что движение трихома или вращение колец слизи начиналось уже через несколько секунд после включения света, освещавшего малую часть трихома. Расчет показал, что диффузия глюкозы или АТФ из конца в конец трихома длиной в 1 миллиметр потребовала бы многих минут. Кроме того, движение от светового пятна можно было наблюдать на трихомах, обработанных специфическим ингибитором, выключившим протонную АТФ-синтетазу. В таких трихомах свет образовывал протонный потенциал, но не АТФ.

Прямой опыт, доказавший передачу электроэнергии вдоль трихомов, был поставлен Л. Чайлахяном, Т. Потаповой и Т. Глаголевой. Когда я попросил наших электрофизиологов попытаться измерить вольтметром распространение потенциала по трихомам, Л. Чайлахян предложил использовать для этой цели внеклеточные электроды. Такой деликатный метод давно уже применяется для изучения распространения нервного импульса. Он позволяет зарегистрировать электрическую передачу без введения электрода внутрь клетки, которое всегда создает опасность короткого замыкания в месте прокола мембраны электродом; эта опасность особенно велика для мембран, несущих протонный потенциал, вследствие их высокого электрического сопротивления.

Трихомы были аккуратно уложены в заполненную водой бороздку, прочерченную на бруске плексигласа.

К трихомам подвели четыре электрода. Электроды 1 и 4 расположили у противоположных концов бороздки, электроды 2 и 3 — на расстоянии $\frac{1}{3}$ и $\frac{2}{3}$ пути от электрода 1 к электроду 4. Тонким лучом света высветили небольшую часть трихомов вблизи электрода 1 и измерили разность потенциалов между электродами 1—4, 2—4 и 3—4.

Предсказание нашей гипотезы состояло в том, что между электродами 1 и 4 возникнет разность потенциалов, причем ее направление будет соответствовать выходу положительных зарядов (H^+) из клетки во внешнюю среду в освещенной части трихомов, то есть в области электрода 1. Между остальными электродами тоже должна была возникнуть разность (ΔV) потенциалов, убывающая в следующем порядке: $\Delta V_{1-4} > \Delta V_{2-4} > \Delta V_{3-4}$. Во всех случаях разность потенциалов, достигнув максимума, должна была затем со временем снижаться, причем спад должен был, судя по опытам с движением, происходить в секундной шкале.

Как видите, предсказан был феномен, охарактеризованный достаточно четко, по крайней мере на качественном уровне. И что же? Световое пятно действительно вызвало генерацию разности потенциалов со всеми свойствами, перечисленными выше.

Затем мы задали работу нашей вычислительной машине. В нее были заложены основные параметры трихома, действующего подобно электрическому кабелю, после чего машине было предложено вычислить динамику изменения разности потенциалов ΔV_{1-4} , ΔV_{2-4} и ΔV_{3-4} . К нашей радости, машина начертила кривые, очень похожие на те, что были получены в эксперименте.

Кабельная гипотеза была доказана. Мы обнаружили-таки долгожданный прецедент: электрическая мощность передавалась вдоль мембран на несколько миллиметров — расстояние, огромное по масштабам клетки.

К НОВЫМ РУБЕЖАМ

Путь к открытию напоминает восхождение. Не потому ли среди ученых так популярен альпинизм? Здесь как никогда важна интуиция: куда идти, когда впереди глыба горы и вет обзор? Но вот, если удача сопутствовала вам, взят перевал, и перед вами внезапно возник далекий горизонт. Вы поражены открывшимся видом: слов нет, прекрасная панорама — и, кажется, забыт оставшийся позади подъем. Однако давайте все же обернемся, чтобы бросить взгляд на пройденный путь.

С чего началась современная биоэнергетика? С накопления множества разрозненных фактов — сведений о мембранах, инкрустированных окислительными и фосфорилирующими ферментами. Глыба этих фактов заслоняла смысл протекающих в мембранах превращений, пока в 1961 году не выступил П. Митчел, ученый, еще не внесший своей лепты в копилку фактов, но указавший путь к их осмыслению.

Принято говорить, что в наши дни научный прогресс невозможен без участия больших коллективов ученых. Канул в вечность образ чудака-мыслителя, творящего в уединении на свой страх и риск. Казалось бы, для биоэнергетики эта истина очевидна: здесь одна только подготовка к опыту занимает уйму времени, а сам опыт, как правило, требует сложнейшей аппаратуры.

Пример Митчела опровергает эту догму, вновь подтверждая, что главное в науке — это мысль.

Я думаю, не случайно новая гипотеза была подхвачена у нас в стране, где в фундаментальной науке нет столь жесткой, как на Западе, конкуренции и от нее не требуют сиюминутной прибыли. Сыграло роль и то, что весь ход наших работ на рубеже 50-х и 60-х годов привел к отрицанию общепринятой тогда химической концепции биоэнергетики. Это освободило нас от шор старых представлений и подготовило к восприятию новой теории.

Ожесточенная борьба мнений вокруг химической схемы и гипотезы протонного потенциала привела к резкому расширению исследований по мембранной био-

энергетике во многих странах. В результате ключевые положения новой гипотезы были подтверждены, а старая схема и компромиссные варианты оставлены.

С легкой руки Митчела в биоэнергетике стало популярно слово «предсказание». От новой концепции в биоэнергетике теперь требуют не только объяснения уже описанных фактов, но и предвидения новых, еще неизвестных черт и свойств объясняемого явления. Это задача всегда чрезвычайно сложная, в особенности если речь идет о такой многоликой системе, как живой организм.

Я замечал, что вопрос «Каковы предсказания вашей концепции?» иногда воспринимается ученым как некое чрезмерное требование, будто его просят явить чудо: — Я не пророк, чтобы предсказывать!

Здесь уместно вспомнить слова В. И. Ленина: «В чуждеса теперь, слава богу, не верят. Чудесное пророчество есть сказка. Но научное пророчество есть факт».

И если от биоэнергетиков теперь требуют пророчеств, то здесь надо видеть лишь признание высокого уровня, достигнутого этой наукой. Наоборот, отказ от испытания науки на предсказательную силу выхолащивает ее содержание и способствует «выживанию» заведомо слабых идей.

Перевал, достигнутый биоэнергетиками в конце семидесятых годов, знаменует собой смену направления исследований: от выяснения принципа устройства молекулярных преобразователей энергии мы перешли к изучению точного механизма их действия.

А. Сцент-Дьердьи, давший биоэнергетике ее имя, как-то сказал: «Попросите химика выяснить, что такое динамо-машина, и первое, что он сделает, это растворит ее в серной кислоте. Биохимик, вероятно, разобрал бы ее на части и описал подробно каждый виток обмотки». К этому образному сравнению можно лишь добавить, что молекулярный биолог считал бы свою задачу выполненной только после того, как повторил работу биохимика в обратном порядке и собрал бы действующую динамо-машину из составных частей. А это невозможно без чертежа, без детальных знаний о механизме.

Но было бы ошибочным считать, что путь к познанию устройства белков-генераторов — единственная перспектива, открывшаяся нам с высоты теории протонного цикла. Мы увидели новые подходы к решению це-

лого ряда классических проблем биологии, ждавших своего срока многие десятки лет. В этой книге я рассказал лишь о некоторых. Среди них роль калий-натриевого градиента, передача энергии по мембране как по электрическому кабелю, молекулярные основы зрения и т. д. На этих путях уже достигнуты первые успехи.

Нельзя не сказать о возможных последствиях открытий биоэнергетиков для практической деятельности человека, хотя в этом важнейшем деле нашей науке долгое время фатально не везло. Пастер, которого Ракер считает первым биоэнергетиком, прославился прежде всего, конечно, своим вкладом в медицину, а вовсе не выяснением того факта, что брожение вызывается микроорганизмами. Тем не менее последнее открытие было затем широко использовано в пивоварении. Фабрикант знаменитого голландского пива Хайнекен основал не так давно особый фонд, из которого раз в три года выделяется изрядная сумма на премирование лучшей работы в области биохимии. Этим он решил воздать должное незаслуженно отодвинутому на второй план открытию Пастера, а заодно прославить свою фирму.

В 1905 году А. Харден и У. Йонг обнаружили, что для брожения необходим фосфат, а в 1914 году один очень известный немецкий биохимик предложил добавлять фосфат в питьевую воду для солдат кайзеровской армии, «чтобы улучшить энергообеспечение их организмов на марше». Этот экскурс биоэнергетики в военную практику кончился громким конфузом: солдатские желудки пришли в такое расстройство, что маршбросок пришлось остановить у ближайших придорожных кустов.

Лет через тридцать после этого случая поспешное применение новых биоэнергетических сведений повлекло за собой более трагические последствия, чем понос в пехотном батальоне. Когда выяснилось, что разобщи́тель динитрофенол нарушает ассимиляцию пищи, его попытались применить как средство от ожирения. Люди, получавшие динитрофенол, действительно похудели, но спустя некоторое время у них началось тяжелое нарушение зрения. Неудивительно, что толстяки, оказавшись перед дилеммой: остаться полными, но зрячими, или стать стройными, но слепыми, — отказались от рекомендаций врачей, увлекшихся биоэнергетикой.

Да, биоэнергетики в долгу перед медициной. Мы

слишком долго сами блуждали впотьмах, чтобы взять на себя смелость указывать путь другим. Однако с каждым прорывом на новый уровень знания прояснялась картина того, что происходит в клетках человеческого организма.

Мы уже можем точно сказать, как действуют многие лекарства. Грамицидин, например, нарушает изолирующий барьер мембран. В этом действии он неразборчив; что бактерия, что клетка больного — все равно. Поэтому грамицидин можно применять как полоскание, но не внутрь. Другое дело левомицетин: он блокирует синтез белка в бактериях и в наших митохондриях, но не влияет на этот процесс в цитоплазме клетки человека.

Левомицетин не столь опасен, как грамицидин, и если все же дает побочные эффекты, то их причину надо искать прежде всего в нарушении энергетики митохондрий.

Или фенилин, антикоагулянт, предотвращающий тромбозы, — довольно сильный разобщитель-протонофор. При передозировке есть опасность превратить в тепло всю энергию дыхания.

Объяснить болезнь еще не значит ее вылечить. Но это путь к научному поиску правильного способа лечения.

Мы знаем, что амитал, барбамил и другие снотворные-барбитураты блокируют дыхание в митохондриях на уровне первого протонного генератора дыхательной цепи. Есть вещества, введение которых приводит к образованию нового пути переноса электронов в обход поврежденного участка цепи. Так действует, например, витамин K_3 . А такой субстрат дыхания, как янтарная кислота, подключается к дыхательной цепи после звена, атакованного амиталом. Как знать, может быть, Мэрилин Монро осталась жива, не опоздай биоэнергетика на пару лет со своим открытием эффекта янтарной кислоты и витамина K_3 ?

Иногда задают вопрос: «А что может дать биоэнергетика для решения проблем энергетического кризиса?» Здесь прежде всего приходит на ум использование белков — генераторов фототока в качестве солнечных батарей. Действительно, такие батареи, судя по нашим данным, могут быть экономичнее подобных устройств, используемых сегодня в технике.

Если говорить о бактериородопсине, самом простом и стабильном среди белков-генераторов, то его практическое применение ограничивается прежде всего тем, что этот компонент приходится включать в очень тонкие, а потому нестойкие липидные пленки, соизмеримые по толщине с природными мембранами (то есть 70 ангстрем, или 7 миллионных долей миллиметра). Перенести протон через более толстые пленки бактериородопсину не удастся.

Хлорофилл-белковые комплексы сложнее бактериородопсина, зато есть шанс сорбировать их на электроде, с тем чтобы они переносили электроны с какого-либо вещества-донора на электрод.

Другой вариант — сорбировать на электродах окислительно-восстановительные ферменты и попытаться создать биологический топливный элемент.

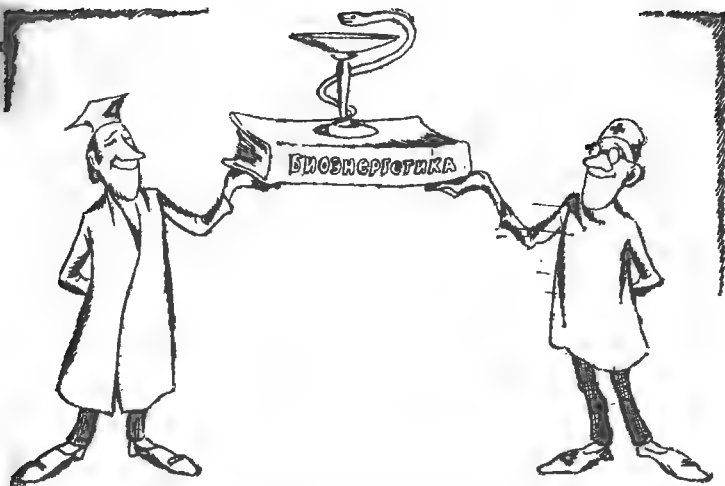
В нашей лаборатории С. Варфоломеев и его коллеги взяли два таких фермента: один, окисляющий водород, и другой, восстанавливающий кислород. Сорбируя на одном электроде фермент-окислитель, а на другом фермент-восстановитель, они получили постоянный ток. При этом на первом электроде протекала реакция

$$\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}, \text{ на втором — } \frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{e} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}.$$

У такого топливного элемента оказался целый ряд бесспорных преимуществ и только один недостаток, но весьма досадный: ферменты, как всякие белки, имели малый срок жизни. Этот срок удалось резко продлить, когда в качестве сырья для получения ферментов вместо обычных бактерий взяли особый вид бактерий-термофилов.

За термофилами пришлось ехать на Камчатку. Там есть вулкан, из кратера которого вытекает нагретая до +130 градусов концентрированная серная кислота. У подножия горы поток кислоты впадает в речку с обычной водой. Чуть ниже места впадения, там, где температура «всего» +70 градусов, и был обнаружен особый вид бактерий, ферменты которых отличаются исключительной стабильностью. Достаточно сказать, например, что для активности фермента, окисляющего водород, температурный оптимум оказался +90 градусов.

Вернувшись в Москву с небольшим количеством удивительных бактерий, С. Варфоломеев наладил их культивирование и получил достаточное количество ферментов, чтобы поставить опыт по генерации тока. С этими



ферментами стабильность биологического топливного элемента превзошла все ожидания: он мог работать месяцами.

Еще одна проблема биоэнергетики будущего — это биосинтез АТФ в промышленных масштабах. Хотим мы того или нет, но человечество идет к получению пищевых продуктов синтетическим путем. Чтобы решить эту задачу, потребуется синтез белков, жиров, углеводов и витаминов из простых соединений: углекислого газа, воды, аммиака — при участии соответствующих ферментов. Ферменты эти должны обеспечиваться энергией. АТФ — наиболее универсальная форма энергии, которую «узнают» такие ферменты. Вот почему фабрики синтетической пищи будут потреблять АТФ, как ГРЭС — уголь.

Массовые количества АТФ можно было бы производить за счет света в стабилизированных тем или другим способом протеолипосомах, содержащих бактериородопсин и протонную АТФ-синтетазу из термофильной бактерии. В сопряжении этих двух весьма устойчивых ферментов — преобразователей энергии видится сегодня тот наиболее перспективный принцип, который можно было бы положить в основу технологии производства АТФ.

Вскрытие механизма работы уже описанных биологических преобразователей энергии и практическое при-

менение добытых знаний — вот ближайшая перспектива биоэнергетики.

А что, если попытаться заглянуть в более далекое будущее? Прогнозы в науке — неблагодарное дело. И тем не менее...

Давайте сначала обернемся назад и попробуем проследить, каким путем шли биоэнергетики все годы, составившие новейшую историю их науки. Быть может, продолжив этот путь в грядущее, нам удастся представить себе, что ждет нас впереди.

Безусловно, важнейшей вехой на пути биоэнергетики было открытие нового типа преобразования энергии в клетке — генерации протонного потенциала. Это открытие было подготовлено долгими и, казалось бы, бесплодными поисками, блужданиями в дебрях необъяснимых фактов, которые привели в конце пятидесятих годов к пониманию того, что есть крупная нерешенная проблема — механизм окислительного фосфорилирования, не поддающийся объяснению в рамках привычных научных догм. В описании энергетики клетки пропущен какой-то важнейший аспект — вот ощущение того времени, что предшествовало рождению концепции протонного потенциала.

А как сегодня выглядит биоэнергетическая карта клетки? Есть ли на ней крупное «белое пятно», нерешенная проблема, по масштабам своим соизмеримая с загадкой окислительного фосфорилирования? Все ли типы биологических преобразователей энергии нам известны теперь, после открытия протонного потенциала?

Впечатление таково, что мы свели наконец концы с концами и на карте энергетических превращений не осталось достаточно обширных свободных мест. Но ведь такое же мнение складывалось в сороковые-пятидесятые годы, когда совершала свое триумфальное шествие концепция Липмана об АТФ как единственной конвертируемой форме энергии в живых системах.

Возникнет ли новый кризис идей в биоэнергетике? Если возникнет, я этому не удивлюсь. «Гораций! Много в мире есть такого, что вашей философии не снилось». Гамлет мог бы произнести эти слова и сегодня.

Недавно была обнаружена бактерия — спирилла, накапливающая в цитоплазме кристаллы окиси железа, частицы которого располагаются вдоль длинной оси клетки. Эти бактерии чувствуют магнитное поле. Они

безошибочно ориентируются в пространстве относительно магнитных полюсов Земли, различая север и юг. Как намагничивают бактерии крупинки железа? Как реагируют они на магнитное поле? Какую роль играет эта их способность для жизнедеятельности? На все эти вопросы мы пока не можем ответить даже приблизительно. А ведь речь идет о магнетизме — давно изученном физиками явлении.

Что же сказать о гравитационном поле, если биологический аспект этой проблемы остается уделом «специалистов по телекинезу», которые вынуждены предполагать существование неизвестных физике «генераторов гравитации»!

Электрический ток был открыт Гальвани в опытах с лягушкой двести лет назад. Так биолог подарил физикам новый огромный раздел их науки. Как знать, не ждет ли физиков в будущем еще один такой подарок? Ведь история повторяется, в том числе и история науки...

Мы подошли к последней странице этой книги. Я пишу ее на вольном воздухе. В лицо упруго катит волны воздушный океан. Он раскачивает щиты оргстекла в деревянной раме — нехитрую оснастку моего «кабинета» на лоджии десятого этажа. Оснастка чуть колеблется и поскрипывает. Слева внизу милый сердцу лабораторный корпус. Впереди, на горизонте, у самой его черты, какое-то новое Беляево или Чертаново белеет грядой строек, а справа вдали Останкинская телебашня болит занозой в лиловом московском небе. Я очень горд этим своим открытием — писать на воле, в любую погоду, пока не замерзнут чернила...

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть I

ИСТОРИЯ НОВОЙ НАУКИ

Глава 1. ЧЕМ ЗАНИМАЮТСЯ БИОЭНЕРГЕТИКИ?	
Рождение биоэнергетики	4
Глава 2. ЧТО ТАКОЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН?	
Как клетка получает и использует энергию	9
АТФ — разменная валюта клетки	11
Где и как образуется АТФ?	12
Глава 3. ОТ МИРМИКОЛОГИИ К БИОЭНЕРГЕТИКЕ	
Муравьиный язык	15
Митохондрии производят АТФ в пробирке	18
Глава 4. ДВА ПУТИ	
Факт или артефакт?	22
Стриженные голуби	25
Бурый жир	28
Глава 5. КРЕПКИЙ ОРЕШЕК	
Жертва «закона Паркинсона»	33
Ложная аналогия	36
Парадокс веществ-разобинителей	39
Глава 6. МИТЧЕЛ И ЕГО ДОГАДКА	
Начало пути	41
Чисто умозрительное построение	44
Хемиосмотическая гипотеза	46
Корни гипотезы	49
Одна из многих гипотез?	50
Глинн Хауз. Ослы и дети	50
Глава 7. ПОРАЖЕНИЯ И ПОБЕДЫ	
«Глинновские лаборатории»	53
Первые опыты Митчела и Мойл	54
«Варшавская битва». Поражение	55
Серебряный звук трубы	57
Первая «Серая книга» Митчела	58
Протонофоры	61
Красные флажки на карте	64
Конформационная гипотеза	67
Ягсидорф, Витт, Булычев и другие	68
«Чудо-ионы»	70
История повторяется	74
Карфаген должен быть разрушен!	76
Протеолипосомы	79
Глава 8. БЕЛКИ — ГЕНЕРАТОРЫ ТОКА	
Драчев и бактериородопсин	84

Суп из топора	86
Последняя капля	89

Глава 9. ПРИЗНАНИЕ

Принцип Митчела	92
Нобелевский лауреат	94
Ароморфозы в науке и «комплекс Герострата»	98
Йоги и биоэнергетика	101

Часть II

БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

Глава 1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЭЛЕКТРОСТАНЦИИ

Протонная АТФ-синтетаза	104
Цитохромоксидаза	111
Хлорофильные генераторы	116
Фотосинтез без хлорофилла	120
Родопсин и зрение	138

Глава 2. ЭЛЕКТРОДВИГАТЕЛЬ, ИЗОБРЕТЕННЫЙ БАКТЕРИЕЙ

Флагелла, крюк и диски	151
Протонный потенциал движет бактерией	154
Вращение хлоропластов	160

Глава 3. ДВОЙНАЯ БУХГАЛТЕРИЯ ЖИВОЙ КЛЕТКИ

Зачем клетка обменивает натрий на калий?	168
Электрический кабель цианобактерий	173

Глава 4. К НОВЫМ РУБЕЖАМ 182

Скулачев В. П.
С46 Рассказы о биоэнергетике. 2-е изд. — М.: Мол.
гвардия, 1985 — 191 с., ил. — (Эврика).

В пер.: 50 к. 100 000 экз.

О становлении и борьбе идей в биоэнергетике, о том, ка-
ким образом ученым удалось заглянуть в мир функциониру-
ющих белковых молекул, рассказывает автор — член-корре-
спондент Академии наук СССР.

С 2001040000—292
078(02)—85 286—85

ББК 28.071
57.04

ИБ № 4629

Владимир Петрович Скулачев

РАССКАЗЫ О БИОЭНЕРГЕТИКЕ

Редактор **Л. Антонию**

Художник **А. Колли**

Художественный редактор **Т. Войтневич**

Технический редактор **Е. Михалева**

Корректор **В. Назарова**

Сдано в набор 10.06.85. Подписано в печать 26.11.85. А00974.
Формат 84×108¹/₃₂. Бумага типографская № 2. Гарнитура
«Литературная». Печать высокая. Усл. печ. л. 10,08. Усл. кр.-
отт. 10,5. Уч.-изд. л. 10,1. Тираж 100 000 экз. (50 001—
100 000 экз.). Цена 50 коп. Заказ 804.

Типография ордена Трудового Красного Знамени издательства
ЦК ВЛКСМ «Молодая гвардия». Адрес издательства и типо-
графии: 103030, Москва, К-30, Суцневская, 21.

Звездка



ВЛАДИМИР ПЕТРОВИЧ
СКУЛАЧЕВ

Член-корреспондент Академии наук СССР Владимир Петрович Скулачев — один из первых лауреатов премии Ленинского комсомола, человек известный в кругу биоэнергетиков. Начал он с того, что стриг голубей и в результате обнаружил новый путь окисления питательных веществ в клетках тканей животных. Потом он выяснил, что, исследуя энергетику клетки, биохимики недосчитались одной из двух форм «конвертируемой энергетической валюты», роль которой наряду с известным каждому школьнику АТФ выполняет протонный потенциал. Послушать об этом открытии Скулачева собрались в Торонто восемь тысяч его коллег — делегатов II Всемирного биохимического конгресса. Знаменитый голландский биохимик Э. Слейтер назвал Скулачева в числе трех ученых, чьи работы доказали справедливость новой (хемиосмотической) гипотезы биоэнергетики, выдвинутой Митчелом, за что автор гипотезы был отмечен Нобелевской, а автор этой книги и его сподвижники — Государственной премиями